

**Charakterisierung eines
neuartigen Aminosäure-Effluxsystems
von *Escherichia coli***

DISSERTATION
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

vorgelegt von
Tobias Daßler
aus München

Februar 2001

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Schartau

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2001

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
1. Einsatzbereiche und Herstellung von Aminosäuren	2
2. L-Cystein - Ein zentraler Baustein des Lebens	3
2.1. Aufgaben von L-Cystein im Organismus	3
2.2. Kommerzielle Anwendung von L-Cystein und verschiedener Derivate	3
3. Großtechnische Produktion von L-Cystein	4
3.1. Konventionelle Verfahren	4
3.2. Fermentative Produktion von L-Cystein mit <i>E. coli</i> - Ein neuer Prozeß	5
3.2.1. L-Cystein-Biosynthese in <i>E. coli</i>	5
3.2.2. Konstruktion eines Cystein-Produktionsstammes von <i>E. coli</i>	8
4. Aufgabenstellung	10
B. MATERIAL UND METHODEN	11
1. Mikrobiologische Methoden	11
1.1. Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen	11
1.2. Allgemeine Nährmedien und Anzuchtbedingungen	13
2. Molekularbiologische Methoden	14
2.1. Oligonukleotide	14
2.2. Standardmethoden	14
2.3. Polymerase-Kettenreaktion	15
3. Genetische Methoden	15
3.1. Transformation von Bakterien	15
3.2. Transduktion mit Hilfe des Bakteriophagen P1	15
3.3. Integration von <i>lacZ</i> -Fusionen in das Chromosom von <i>E. coli</i>	16

4.	Biochemische Methoden	16
4.1.	Analyse von Proteinen	16
4.1.1.	Elektrophorese von Proteinen	16
4.1.2.	Bestimmung des Proteingehalts von ganzen Zellen	16
4.1.3.	Radioaktive Markierung von YdeD mit dem T7-Promotor/Polymerase-System	17
4.1.4.	Differentielle Zentrifugation	17
4.2.	Cystein-Bestimmung	17
4.3.	Bestimmung von Aminosäuren	17
4.4.	Glukose-Bestimmung	18
4.5.	Präparation von [¹⁴ C]-O-Acetylserin	18
4.6.	Dünnschichtchromatographie	18
5.	Physiologische Methoden	18
5.1.	β-Galaktosidase-Test	18
5.2.	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Azaserin	18
5.3.	<i>In vivo</i> -Transport von [¹⁴ C]-Aminosäuren	19
6.	Datenverarbeitung	19
7.	Bezugsquellen besonderer Chemikalien	20
C.	ERGEBNISSE	21
1.	Charakterisierung des <i>ydeD</i>-Locus	21
1.1.	Nachweis des <i>ydeD</i> -Genprodukts	21
1.1.1.	Klonierung des <i>ydeD</i> -Gens in die Expressionsvektoren pT7-5 und pT7-6	22
1.1.2.	Spezifische Markierung des YdeD-Proteins mit [³⁵ S]-Methionin	22
1.2.	Bestimmung des Translationsstartcodons des <i>ydeD</i> -Gens	23
2.	YdeD ist ein integrales Membranprotein	25
2.1.	Bestimmung der zellulären Lokalisation des YdeD-Proteins	25
2.2.	Einordnung von YdeD in eine neue Familie von Membranproteinen	27
3.	Phänotypische Charakterisierung eines <i>E. coli</i>-Wildtypstammes bei YdeD-Überproduktion	29
3.1.	Cystein-Exkretion bei YdeD-Überproduktion in einem <i>E. coli</i> -Wildtypstamm	29
3.2.	Abhängigkeit des Wachstums von der Schwefel-Quelle	31

3.3.	Induktionsstatus des Cystein-Regulons bei YdeD-Überproduktion	32
3.3.1.	Wachstum bei unterschiedlicher Induktion des Cystein-Regulons	32
3.3.2.	Bestimmung des Induktionsstatus' des Cystein-Regulons	33
3.3.3.	Zeitlicher Verlauf der Induktion des Cystein-Regulons	35
4.	Exkretion verschiedener Metabolite des Cystein-Stoffwechsels	36
4.1.	Nachweis von O-Acetylserin und N-Acetylserin im Medium	36
4.2.	Nachweis der 2-Methyl-2,4-Thiazolidindicarbonsäure im Medium	38
4.3.	Zusammenhang zwischen der Exkretion von O-Acetylserin und Cystein	40
4.3.1.	Zeitlicher Verlauf der O-Acetylserin- und Cystein-Exkretion	40
4.3.2.	Zusammenhang zwischen der Wiederaufnahme von O-Acetylserin oder N-Acetylserin mit der Cystein-Exkretion	41
4.3.3.	Cystein-Exkretion nach O-Acetylserin-Supplementation ohne YdeD-Überproduktion	43
5.	<i>In vivo</i>-Transportstudien mit potentiellen Substraten von YdeD	44
5.1.	Aufnahme von [¹⁴ C]-Cystin	45
5.2.	Aufnahme von [¹⁴ C]-O-Acetylserin	48
6.	Analyse weiterer Exkretionsprodukte bei YdeD-Überproduktion	49
6.1.	Verlauf der Exkretion von Asparagin und Glutamin	50
6.2.	Exkretionsprodukte der spätstationären Phase	51
6.3.	Wachstum nach Supplementation mit aliphatischen Aminosäuren	52
7.	Azaserin-Resistenz bei YdeD-Überproduktion	53
8.	Ansätze zur Charakterisierung der Funktion von YdeD in Wildtypzellen	56
8.1.	Phänotypische Charakterisierung einer <i>ydeD</i> -Insertionsmutante	56
8.2.	Charakterisierung der <i>ydeD</i> -Expression mittels einer Reportergen-Fusion	57
8.2.1.	Konstruktion einer transkriptionellen und einer translationalen <i>lacZ</i> -Fusion mit der Promotorregion von <i>ydeD</i>	57
8.2.2.	Integration der <i>ydeD-lacZ</i> -Fusionen in das Chromosom von <i>E. coli</i> MC4100	59
8.2.3.	Effekt des Transkriptionsaktivators MarA auf die Expression einer <i>ydeD-lacZ</i> -Fusion	59
8.2.4.	Expression des <i>ydeD</i> -Gens unter verschiedenen Anzuchtbedingungen	60

D.	DISKUSSION	62
1.	YdeD, ein neuartiges Effluxsystem für Aminosäuren	62
2.	Physiologische Konsequenzen der YdeD-Überproduktion	63
2.1.	Exponentielle Wachstumsphase	63
2.2.	Frühstationäre Wachstumsphase	65
3.	Substrate für YdeD	66
4.	Rolle von YdeD in der Cystein-Produktion	67
5.	Rolle von YdeD im Wildtyp	69
5.1.	Expression des <i>ydeD</i> -Gens	69
5.2.	YdeD-Mutante	70
6.	Offene Fragen	70
E.	ZUSAMMENFASSUNG	72
	LITERATURVERZEICHNIS	74

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Ap	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
<i>cat</i>	Chloramphenicol-Resistenzgen
DC	Dünnschichtchromatographie
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>kan</i>	Kanamycin-Resistenzgen
kb	Kilobasen
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MOPS	3-(Morpholino)-Propansulfonsäure
NAS	N-Acetylserin
OAS	O-Acetylserin
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
P30	Sediment einer Zentrifugation bei 30.000 g
P100	Sediment einer Zentrifugation bei 100.000 g
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonsäurefluorid
S30	Überstand einer Zentrifugation bei 30.000 g
S100	Überstand einer Zentrifugation bei 100.000 g
SDS	Natriumdodecylsulfat
Str	Streptomycin
<i>tet</i>	Tetracyclin-Resistenzgen
Thiazolidin	2-Methyl-2,4-Thiazolidindicarbonsäure
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
wt	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung

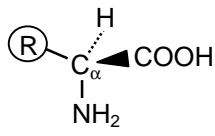
A. EINLEITUNG

Aminosäuren sind relativ einfache organische Verbindungen, die als Charakteristikum ihrer molekularen Struktur mindestens eine Aminogruppe und eine Carboxylgruppe besitzen. Dabei stellen die proteinogenen α -Aminosäuren die bedeutendste Gruppe innerhalb der natürlich vorkommenden Aminosäuren dar. Neben ihrer Hauptaufgabe als Strukturbestandteile von Proteinen spielen viele auch als Ausgangsstoffe in der Biosynthese verschiedener zellulärer Verbindungen, wie z. B. Purinen und Pyrimidinen, Phospholipiden, Tetrapyrrolen, Glutathion und Enzym-Cofaktoren wie Nicotinamidadenindinucleotid, Tetrahydrofolsäure und Thiamin eine wichtige Rolle.

α -Aminosäuren sind optisch aktive Substanzen, da bei ihnen, mit Ausnahme von Glycin, das α -Kohlenstoffatom mit vier verschiedenen Liganden (COOH, NH₂, H und einer variablen Seitenkette (R)) (Tab. 1) verknüpft ist. Biologische Relevanz hat aber in der Regel nur die jeweilige L-Konfiguration, wobei jedoch auch D-Formen bestimmter Aminosäuren z. B. in bakteriellen Zellwänden, in Peptidantibiotika und in Pflanzen natürlicherweise vorkommen.

Viele der proteinogenen Aminosäuren können nur von Pflanzen und Mikroorganismen synthetisiert werden. So müssen beispielsweise der Mensch und andere Säugetiere einen Großteil dieser Aminosäuren mit der Nahrung aufnehmen, weshalb man sie auch als essentielle Aminosäuren bezeichnet (Tab. 1).

Tabelle 1: Für den Menschen essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren

			
essentiell		nicht-essentiell	
L-Histidin	L-Threonin	L-Alanin	L-Glutaminsäure
L-Isoleucin	L-Tryptophan	L-Arginin	Glycin
L-Leucin	L-Valin	L-Asparagin	L-Prolin
L-Lysin		L-Asparaginsäure	L-Serin
L-Methionin		L-Cystein	L-Tyrosin
L-Phenylalanin		L-Glutamin	

Viele Nahrungs- und Futtermittel wie z. B. Reis, Mais, Getreide oder Sojabohnen sind allerdings relativ arm an essentiellen Aminosäuren wie Lysin, Methionin und Threonin. Um den Bedarf an diesen Verbindungen decken zu können und um allgemein den Nährwert zu erhöhen, muß die Nahrung meist mit den limitierenden Aminosäuren entsprechend supplementiert werden.

1. Einsatzbereiche und Herstellung von Aminosäuren

Aminosäuren haben eine enorme wirtschaftliche Bedeutung. Weltweit werden derzeit mehr als 1,8 Millionen Jahrestonnen (jato) verschiedener Aminosäuren mit einem Marktvolumen von ca. sechs Milliarden US-Dollar erzeugt (Stand 1998, Burkovski und Krämer, 1999). Den Hauptanteil mit mehr als 1.000.000 jato macht dabei L-Glutaminsäure aus, gefolgt von DL-Methionin und L-Lysin mit jeweils etwa 350.000 jato. Die Bedeutung der Aminosäureproduktion zeigt sich aber auch in der breiten Palette von Anwendungsbereichen. Dabei überwiegt der Einsatz im Bereich Ernährung (30%) und Tierfutter (60%) deutlich gegenüber der Verwendung in Medizin und Kosmetik (Burkovski und Krämer, 1999). Eine Auswahl verschiedener Aminosäuren mit der jeweiligen Anwendung ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Kommerzielle Anwendung einiger Aminosäuren

Aminosäure	Anwendung
L-Cystein	Backzusatz; Antioxidans
L-Glutamin	Ulcus-Therapie
L-Glutaminsäure	Geschmacksverstärker
L-Lysin	Zusatz für Nahrungs- und Futtermittel
DL-Methionin	Zusatz für Futtermittel
L-Phenylalanin	Infusionslösungen; Süßstoffsynthese
L-Prolin	Infusionslösungen
L-Threonin	Zusatz für Nahrungs- und Futtermittel

Für die großtechnische Herstellung von Aminosäuren werden verschiedene Verfahren angewandt. Neben der chemischen Synthese (z. B. Glycin, DL-Methionin) und der Extraktion aus Proteinhydrolysaten (z. B. L-Cystein) werden die meisten Aminosäuren heute durch mikrobielle Fermentation erzeugt. Gegenüber der chemischen Produktion hat die Verwendung von Mikroorganismen verschiedene Vorteile: So erfolgt die Synthese der Aminosäuren immer stereospezifisch, das heißt es wird nur die biologisch aktive L-Form gebildet, wodurch die aufwendige Racemat-Trennung, die sich in der Regel an eine chemische Synthese anschließt, entfällt. Außerdem findet im Nahrungsmittelbereich der Einsatz von mikrobiell erzeugten Aminosäuren eine höhere Akzeptanz als Haar- oder Federextrakte. Ein weiterer Vorteil der fermentativen Produktion ist, daß nachwachsende Rohstoffe (z. B. Stärkehydrolysat, Saccharose) oder Nebenprodukte anderer Prozesse (z. B. Melasse) als Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt werden können. Schließlich sind die Rückstände der Fermentation biologisch abbaubar und können z. T. sogar als Futtermittelzusatz verwendet werden.

Im folgenden soll die physiologische und die zunehmende wirtschaftliche Bedeutung der Aminosäure L-Cystein im Detail betrachtet werden.

2. L-Cystein - Ein zentraler Baustein des Lebens

2.1. Aufgaben von L-Cystein im Organismus

L-Cystein und L-Methionin sind die beiden einzigen schwefelhaltigen, natürlich vorkommenden proteinogenen Aminosäuren. Dabei ermöglicht die ungewöhnliche Häufung mehrerer funktioneller Gruppen in unmittelbarer Nachbarschaft (-SH, -NH₂ und -OH) dem Cystein eine Vielfalt an eigenständiger und wechselseitiger Reaktivität (Überblick in Kolbeck, 1996). Eine wichtige Aufgabe übernimmt Cystein als Baustein in Proteinen, wo es häufig durch Ausbildung von Disulfidbrücken eine strukturgebende Funktion hat oder an der Bildung des aktiven Zentrums von Enzymen beteiligt ist. Dabei kann es wie im Falle von Thiolproteasen an der Reaktion direkt teilnehmen oder wie bei Metall-Enzymen die Koordination der Metall-Atome in der jeweiligen prosthetischen Gruppe übernehmen. Desweiteren spielt Cystein als zentrale Aminosäure des Tripeptids Glutathion in verschiedenen Redoxprozessen der Zelle eine wichtige Rolle.

Neben der Aufgabe als Baustein von Proteinen und Peptiden dient Cystein in den meisten Organismen auch als primärer Donor von reduziertem Schwefel bei der Biosynthese von Methionin, Liponsäure, Thiamin, Coenzym A und anderen organischen Verbindungen.

2.2. Kommerzielle Anwendung von L-Cystein und verschiedener Derivate

Die Aminosäure L-Cystein spielt aufgrund ihrer ungewöhnlichen Reaktivität aber nicht nur in der Zelle eine entscheidende Rolle, sondern sie findet auch in zunehmendem Maße - direkt oder in modifizierter Form - in vielen Bereichen des täglichen Lebens Verwendung. Lag der Weltmarktbedarf an Cystein-Produkten vor einigen Jahren noch bei etwas mehr als 1.000 jato (Kolbeck, 1996), so liegt er derzeit bei ca. 3.200 jato mit einem Marktwert von etwa 45 Millionen US-Dollar (C. Winterhalter, persönliche Mitteilung).

Cystein und Cystein-Derivate werden vorwiegend als Reduktionsmittel eingesetzt. Der Hauptanwendungsbereich mit ca. 50% des Jahresbedarfs ist die Verwendung von Cystein-Derivaten als Mucolytika bei Bronchialerkrankungen. Dabei werden vor allem N-Acetylcystein (Shaffner, 1963; Ziment, 1988) und S-Carboxymethylcystein (Pouchelle und Sadoul, 1980; Dollery, 1991) aufgrund ihrer schleimlösenden Wirkung in pharmazeutischen Präparaten appliziert.

Ebenfalls aufgrund seiner starken Reduktionskraft wird Cystein im Nahrungsmittelsektor eingesetzt (ca. 700 jato). Als Backzusatz dient Cystein dazu, den Teig knetfähiger zu machen und das Teigvolumen zu verbessern (Kaur und Bains, 1980; Harinder und Bains, 1988).

Ein nicht unbedeutender Teil des Cysteins mit mehr als 450 jato wird auch bei der Nahrungs- und Futtermittelherstellung als Geschmacksverstärker und zur Herstellung von Fleisch-

aromen verwendet (Morton *et al.*, 1961). Basis für letztere Anwendung ist die Reaktion von Cystein mit reduzierenden Zuckern wie Ribose in der komplexen *Maillard*-Reaktion (Ledl und Schleicher, 1990), die je nach Zugabe weiterer Aminosäuren zu verschiedenen Fleischaromen führt.

Schließlich wird Cystein noch in der Haarkosmetik in Dauerwellenlotionen eingesetzt. Als reduzierendes Agens ist Cystein in der Lage, die Disulfidbrücken des Haares aufzubrechen, welche anschließend in gewünschter Position wieder renaturiert werden können.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten von Cystein im medizinischen Bereich werden derzeit untersucht. So werden Cystein und seine Derivate schon seit längerem als Strahlungsschutzmittel diskutiert, da sie in biologischen Systemen zu den wirkungsvollsten Antioxidantien und Radikalfängern zählen und so die Zellen vor Radikalen, die bei Strahlungseinwirkung auftreten, schützen können (Hikita *et al.*, 1975). Neuerdings werden auch Cystein-Derivate wie Acetylcystein oder rekombinantes Humanthioredoxin als Inhibitoren für die Expression des HIV (Human Immunodeficiency Virus) beschrieben (Newman *et al.*, 1994).

Ein weiteres großes Einsatzgebiet für L-Cystin (> 10.000 t/a) wird derzeit diskutiert: Bisher wurde in der Tierzucht den Futtermitteln vor allem das DL-Racemat von Methionin beigemischt, da besonders die schwefelhaltigen Aminosäuren meist limitierend sind. Die Tiere können aus dem Methionin dann L-Cystein herstellen, wobei allerdings die Effizienz der Verwertung von D-Methionin fraglich ist. Ein Gedanke ist nun, L-Cystin ebenfalls direkt zu füttern, wobei es jedoch noch keine aussagekräftige Studie zur Effizienz der tierischen Verwertung gibt. Für diesen Zweck müsste Cystin auch in einem äußerst kostengünstigen Prozeß hergestellt werden können, um konkurrenzfähig zu sein.

3. Großtechnische Produktion von L-Cystein

3.1. Konventionelle Verfahren

L-Cystein ist heute praktisch noch die einzige Aminosäure, die im großtechnischen Maßstab durch Naturstoffextraktion gewonnen wird (Kolbeck, 1995). Als Rohstoff für die Isolierung dieser Aminosäure dienen cystin-reiche Abfallprodukte wie Schweineborsten, Geflügelfedern und Menschenhaare. Dabei findet das schwarze Haar der Asiaten mit einem Keratin-Gehalt von 15-18% bevorzugt Verwendung. Nach der salzsauren Hydrolyse des Keratins bei hohen Temperaturen läßt sich das schwerlösliche L-Cystin (0,01% (w/v) in Wasser) nach Neutralisation des Hydrolysats leicht ausfällen. Verunreinigungen mit den ebenfalls schwerlöslichen Aminosäuren Tyrosin, Leucin und Isoleucin werden in einem anschließenden Kristallisierungsschritt unter pH-Variation abgetrennt. Allerdings lassen sich

selbst bei optimaler Prozeßführung nur ca. 50% des ursprünglich vorhanden Cystins aus dem Keratin isolieren. Durch elektrolytische Reduktion von L-Cystin wird schließlich L-Cystein hergestellt.

Daneben bestehen noch weitere Cystein-Herstellungsverfahren, die allerdings nur eine untergeordnete Bedeutung im Hinblick auf die Gesamtproduktion haben:

So hat man verschiedene Bakterienstämme isoliert, die L-Cystein aus DL-2-Amino-Thiazolin-4-Carboxylat (ATC), einem Intermediat in der chemischen Synthese von DL-Cystein, bilden können (Sano *et al.*, 1977). Dazu zählen Stämme von *Pseudomonas spec.*, *E. coli*, *Bacillus brevis* und *Micrococcus sodonensis*. Die Bildung von L-Cystein aus ATC läuft über drei enzymatische Schritte, die von der ATC-Racemase, der L-ATC-Hydrolase und der S-Carbamoyl-L-Cystein-Hydrolase katalysiert werden. Diese Enzyme werden jeweils nach Induktion durch ATC gebildet.

In einem anderen Verfahren kommt die nicht nur im Bakterienreich weit verbreitete Cystein-Desulphydrase zum Einsatz, die als Nebenreaktion auch die Synthese von L-Cystein aus β -Chloro-L-Alanin und Na_2S katalysieren kann (Yamada *et al.*, 1976).

Um den laufend steigenden Cystein-Bedarf zu decken und um neue Anwendungsgebiete für diese Aminosäure zu erschließen, wie beispielsweise die Verwendung von Cystin als Futtermittelzusatz, wird heute nach neuen, leistungsfähigen und kostengünstigen Produktionsmethoden gesucht. Dabei wird zur Zeit an einem biotechnologischen Herstellungsverfahren gearbeitet, wodurch letztlich das Cystein-Angebot aus der konventionellen Naturstoffextraktion wesentlich erweitert werden soll. In diesem Verfahren wird L-Cystein durch mikrobielle Fermentation mit einem Produktionsstamm von *E. coli* gewonnen.

3.2. Fermentative Produktion von L-Cystein mit *E. coli* - Ein neuer Prozeß

3.2.1. L-Cystein-Biosynthese in *E. coli*

Die genaue Kenntnis des Stoffwechsels und der jeweiligen Regulationsmechanismen, die die Biosynthese einer bestimmten Aminosäure steuern, ist eine wichtige Voraussetzung für die gezielte gentechnologische Herstellung eines bakteriellen Aminosäureproduktionsstammes.

Wie bereits erwähnt, stellt die Cystein-Synthese in *E. coli* den Hauptmechanismus dar, durch den anorganischer reduzierter Schwefel in eine organische Verbindung eingebaut wird. Cystein nimmt damit eine zentrale Stellung im Schwefelmetabolismus ein und so ist es nicht verwunderlich, daß ein Großteil der Gene für die Cystein-Synthese und die Schwefel-

Reduktion in einer regulatorischen Einheit, dem Cystein-Regulon (siehe unten), zusammengefaßt ist (Tab. 3).

Tabelle 3: Gene des Cystein-Biosyntheseweges in *E. coli*^a

Gen	Aktivität	Teil des Cystein-Regulons
<i>cysA</i>	Sulfat/Thiosulfat-Transport	Ja
<i>cysB</i>	Transkriptionsaktivator	Ja ^b
<i>cysC</i>	Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS)-Kinase	Ja
<i>cysD</i>	ATP-Sulfurylase, katalytische Untereinheit	Ja
<i>cysE</i>	Serin-Transacetylase	Ja ^b
<i>cysG</i>	Uroporphyrinogen III-Methylase	Nein
<i>cysH</i>	Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS)-Sulfotransferase	Ja
<i>cysI</i>	NADPH-Sulfit-Reduktase, Hämprotein	Ja
<i>cysJ</i>	NADPH-Sulfit-Reduktase, Flavoprotein	Ja
<i>cysK</i>	O-Acetylserin-Sulfhydrylase A	Ja
<i>cysM</i>	O-Acetylserin-Sulfhydrylase B	Ja
<i>cysN</i>	ATP-Sulfurylase, GTP-bindende Untereinheit	Ja
<i>cysP</i>	Thiosulfat-Bindeprotein	Ja
<i>cysQ</i>	PAPS-Abbau	?
<i>cysS</i>	Cysteinyl-tRNA-Synthetase	Nein
<i>cysT</i>	Sulfat/Thiosulfat-Transport	Ja
<i>cysT</i>	Cysteinyl-tRNA	Nein
<i>cysW</i>	Sulfat/Thiosulfat-Transport	Ja
<i>cysZ</i>	Sulfat-Transport	?
<i>sbp</i>	Sulfat-Bindeprotein	Ja
	L-Cystin-Aufnahmesystem ^c	Ja

a. Entnommen aus Kredich (1996).

b. Wird dem Cystein-Regulon zugerechnet, obwohl die Expression nicht durch den CysB/N-Acetylserin-Komplex reguliert wird (siehe unten).

c. Gen bisher nicht identifiziert.

Die Biosynthese von Cystein erfolgt über einen verzweigten, konvergenten Weg, bei dem im letzten Schritt reduzierter Schwefel und O-Acetylserin (OAS) unter Bildung von Cystein zusammengeführt werden (Abb. 1). Ist Sulfat die einzige verfügbare Schwefel-Quelle, muß dieses zunächst in einem mehrstufigen Prozeß unter Energieaufwand zu Sulfid reduziert werden (Abb. 1) (Übersicht in Kredich, 1996). Steht den Zellen dagegen reduzierter Schwefel direkt in Form von Sulfid oder Thiosulfat zur Verfügung, ist die Cystein-Biosynthese ein relativ einfacher Prozeß, wobei in nur zwei Schritten die Hydroxyl-Gruppe von Serin durch eine Thiol-Gruppe ersetzt wird (Abb. 1) (Übersicht in Kredich, 1996). Der erste Schritt besteht in der O-Acetylierung von Serin durch die Serin-Transacetylase, dem *cysE*-

Genprodukt. Anschließend erfolgt der von der O-Acetylserin-Sulphydrolase katalysierte Austausch der aktivierten O-Acetyl-Gruppe gegen reduzierten Schwefel. *E. coli* stehen für diese Reaktion zwei Isoenzyme zur Verfügung: Das Isoenzym A (*cysK*-Genprodukt) verwendet ausschließlich Sulfid als Substrat, wodurch als Reaktionsprodukt direkt Cystein gebildet wird. Das Isoenzym B (*cysM*-Genprodukt) kann neben Sulfid auch Thiosulfat verwerten (Nakamura *et al.*, 1983; T. Maier, persönliche Mitteilung), wobei in diesem Fall zunächst S-Sulfocystein entsteht. Für die Cystein-Bildung ist anschließend noch die hydrolytische oder reduktive Spaltung von S-Sulfocystein nötig (Funane *et al.*, 1987).

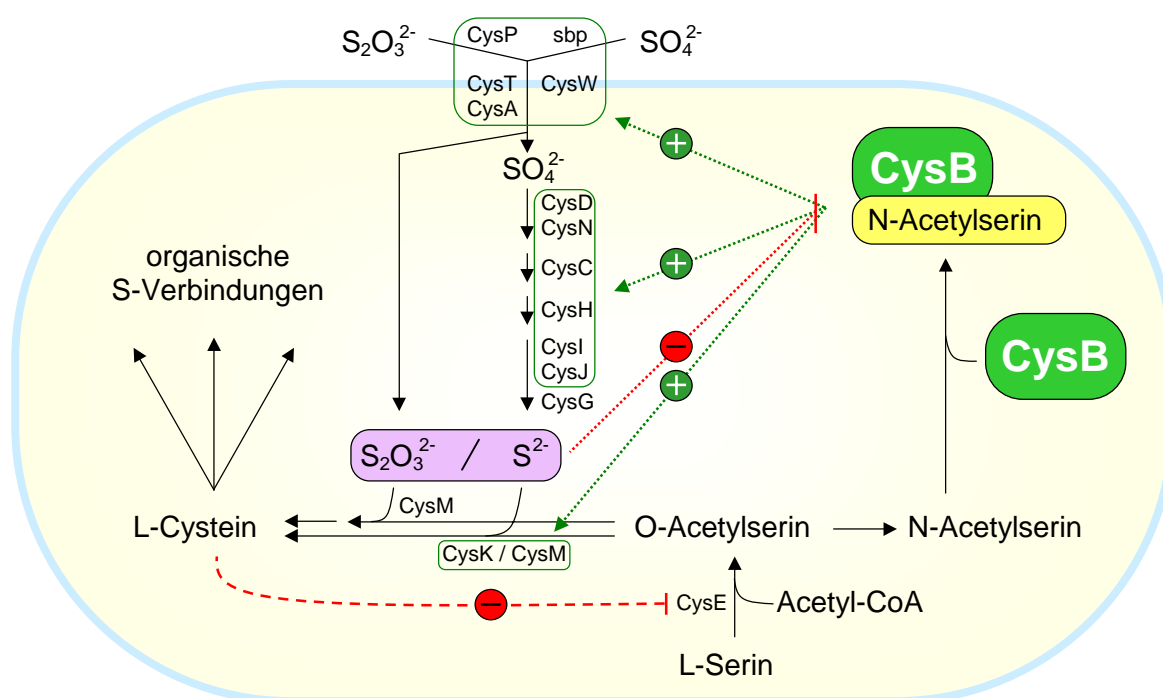


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biosynthese von L-Cystein in *E. coli*. Die Regulation der Transkription von Genen bzw. Operons des Cystein-Regulons durch den CysB/N-Acetylserin-Komplex ist durch gepunktete Linien angedeutet. Dabei ist die Induktion in Grün und die Anti-Induktion durch reduzierte S-Verbindungen in Rot hervorgehoben. Die Regulation über den Mechanismus der Feedback-Inhibition ist durch eine gestrichelte rote Linie dargestellt. Die Aktivitäten der Enzyme des Cystein-Regulons sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Das Cystein-Regulon umfaßt die Gene für die Biosynthese von L-Cystein aus L-Serin, die Gene für das Sulfat/Thiosulfat-Aufnahmesystem sowie für die Sulfat-Aktivierung und dessen Reduktion zu Sulfid (Tab. 3). Wahrscheinlich ist auch eines der beiden Cystin-Aufnahmesysteme von *E. coli* Teil dieses Regulons (Berger und Heppel, 1972). Die Expression dieser Gene bzw. Operons, mit Ausnahme von *cysE* und *cysG*, wird durch den Transkriptionsaktivator CysB reguliert. Dabei ist eine effektive Induktion der Gene des

Cystein-Regulons durch CysB aber erst nach Bindung des niedermolekularen Co-Induktors N-Acetylserin (NAS) möglich (Abb. 1) (Ostrowski und Kredich, 1989; Hryniewicz und Kredich, 1991; Monroe *et al.*, 1990). NAS entsteht aus OAS durch intramolekulare Umlagerung der Acetyl-Gruppe in einer rein chemischen Reaktion, die bevorzugt unter alkalischen Bedingungen abläuft (Flavin und Slaughter, 1965). Die Bildung des Transkriptionsaktivators CysB selbst wird durch negative Autoregulation gesteuert (Bielinska und Hulanicka, 1986; Ostrowski und Kredich, 1991).

Die Cystein-Synthese wird aber auch kinetisch durch das Endprodukt L-Cystein reguliert, das die Aktivität der Serin-Transacetylase effektiv inhibiert (Abb. 1) (Kredich und Tomkins, 1966; Denk und Böck, 1987). Auf diese Weise ist die Bildung von L-Cystein aus L-Serin eng mit der Regulation der Expression der Gene für die Sulfat-Assimilation verknüpft: Ist ausreichend Cystein vorhanden, wird die OAS-Synthese und damit auch die NAS-Bildung gedrosselt, was wiederum einer Induktion des Cystein-Regulons durch CysB entgegenwirkt. Dadurch wird eine übermäßige Akkumulation von Verbindungen wie PAPS, Sulfid und Cystein verhindert, was andernfalls für die Zelle äußerst toxisch wäre (Sørensen und Pedersen, 1991, Delaney *et al.*, 1992, Überblick in Kredich, 1996).

Die Feinregulation der Sulfat-Reduktion und damit der Synthese von Cystein erfolgt über den Mechanismus der Anti-Induktion durch Sulfid und Thiosulfat. Diese Verbindungen sind Indikatoren dafür, daß der Zelle ausreichend Schwefel in reduzierter Form zur Verfügung steht und wirken als sogenannte Anti-Induktoren, indem sie den transkriptionsinduzierenden Effekt des CysB/NAS-Komplexes auf das Cystein-Regulon aufheben (Abb. 1) (Ostrowski und Kredich, 1990; Hryniewicz und Kredich, 1991). Desweiteren wirkt die Reaktion von Sulfid oder Thiosulfat mit OAS der Akkumulation des Co-Induktors NAS entgegen. Demnach ist neben der Präsenz von NAS auch der Mangel an reduzierten S-Verbindungen eine Voraussetzung für die vollständige Induktion des Cystein-Regulons.

Eine bisher ungeklärte Frage ist, ob die Zellen überschüssiges NAS, das zumindest unter physiologischen Bedingungen nicht wieder in OAS umgewandelt werden kann, abbauen oder entsorgen können, um bei Bedarf die Induktion des Cystein-Regulons zu unterbrechen.

3.2.2. Konstruktion eines Cystein-Produktionsstammes von *E. coli*

Neben der ungerichteten Mutagenese mit nachfolgender Selektion auf eine verbesserte Cystein-Produktion wurde auch systematisch in den Cystein-Stoffwechsel bei der Konstruktion eines Produktionsstammes eingegriffen. Ein Ziel dabei war, die Regulation der Biosynthese über die Feedback-Inhibition der Serin-Transacetylase durch das Endprodukt Cystein (Abb. 1) möglichst vollständig aufzuheben. Die Einführung solch einer feedback-resistenten Serin-Transacetylase in den Produktionsstamm hatte bereits eine deutliche

Überproduktion von Cystein zur Folge (Denk und Böck, 1987; Winterhalter und Leinfelder, 1997).

Ein oftmals entscheidender Schritt bei der Verbesserung von Aminosäureproduktionsstämmen ist die Förderung der Exkretion der überproduzierten Verbindung aus der Zelle (Krämer, 1994a; Soda *et al.*, 1983). Auf diese Weise wird die intrazelluläre Akkumulation und damit die Verlangsamung der Aminosäure-Biosynthese verhindert, weil das Endprodukt laufend aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird. Jüngste biochemische Untersuchungen sowie die Genom-Analyse von verschiedenen Organismen belegen, daß eine Vielzahl an derartigen Metaboliten-Effluxsystemen existiert (Vrljic *et al.*, 1996; Harley und Saier, 2000; Aleshin *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999).

Auf der Suche nach Genen, die die Cystein-Exkretion des Produktionsstammes weiter verbessern könnten, wurde dieser Stamm zunächst mit einer *E. coli*-Plasmid-Genbank transformiert und in einem anschließenden Screening wurde auf Kreuzfütterungsplatten (Denk und Böck, 1987) nach Transformanten mit einer verstärkten Fütterungshof-Bildung gesucht. Von etwa 12.000 gesichteten Klonen konnten 20 mit einer verbesserten Cystein-Produktion identifiziert werden. Es wurde gefunden, daß die sechs besten davon die *mar*-Locus-Region (multiple antibiotic resistance) des *E. coli*-Chromosoms im Genbank-Plasmid enthielten (Abb. 2). Subklonierungsexperimente zeigten jedoch, daß keines der bekannten *mar*-gene *marR*, *marA* oder *marB*, sondern daß der benachbarte offene Leserahmen *ydeD* (Blattner *et al.*, 1997) für die erhöhte Cystein-Exkretion verantwortlich war (Winterhalter und Leinfelder, 1997).

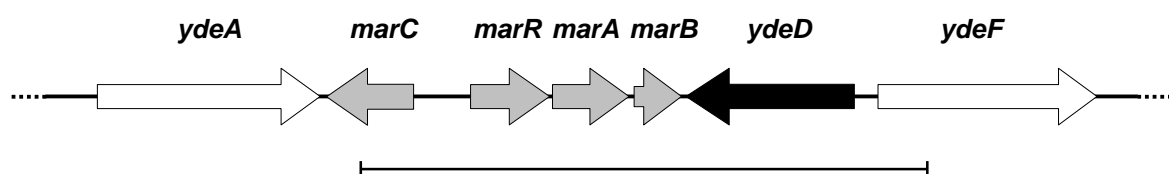


Abbildung 2: *mar*-Locus-Region bei min 34 des *E. coli*-Chromosoms. Der Balken markiert das ursprünglich identifizierte *mar*-Locus-Fragment (Länge ca. 3 kb), das zu einer verbesserten Cystein-Produktion führte.

4. Aufgabenstellung

Für eine gezielte Manipulation des Produktionsstammes zur weiteren Verbesserung der Cystein-Produktion war und ist es von großer Bedeutung, detaillierte Kenntnisse über die Eigenschaften und die Aktivität möglichst aller daran beteiligten Komponenten zu besitzen. Da es sich bei *ydeD* um einen bis dato völlig unbekanntes Leserahmen handelte, bestand die Aufgabe der vorliegenden Arbeit vor allem darin, *ydeD* bzw. dessen Genprodukt hinsichtlich seiner genetischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften umfassend zu charakterisieren. Mit diesen neuen Kenntnissen sollte eine wichtige Voraussetzung geschaffen werden, um weitere systematische Manipulationen am Produktionsstamm vorzunehmen, Fermentationsbedingungen zu optimieren, die Cystein-Ausbeute durch gezielte Mutagenese von YdeD zu verbessern oder das Produktspektrum zu verändern.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Mikrobiologische Methoden

1.1. Bakterienstämme, Plasmide und Bakteriophagen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli* sind mit ihrem Genotyp und der entsprechenden Referenz in Tabelle 4 aufgeführt. Dabei handelt es sich durchweg um Derivate des Stammes K12. Die verwendeten Plasmide und Bakteriophagen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
JM109	F' <i>traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/</i> <i>e14⁻(McrA⁻) Δ(lac-proAB) thi gyrA96</i> <i>(Nal^R) endA1 hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) relA1</i> <i>supE44 recA1</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
K38	HfrC <i>phoA4 pit-10 tonA22 ompf627 relA1 λ⁺</i>	Lyons und Zinder (1972)
KL19	Hfr, PO67, λ ⁺	Low (1968)
MC1061	F- <i>araD139 Δ(araA-leu) Δ(codB-lacI)</i> <i>galK16 galE15 λ⁻ mcrA0 relA1 rpsL150</i> <i>(Str^R) spoT1 mcrB hsdR2</i>	Casadaban (1980)
MC4100	F- <i>araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150</i> <i>(Str^R) relA1 flB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Casadaban und Cohen (1979)
M41TK	MC4100 λTK299	diese Arbeit
M41TL	MC4100 λTL299	diese Arbeit
MC4100Δ299	MC4100 <i>ydeD::kan</i>	diese Arbeit
MC4100::λKZL300	MC4100 <i>λatt::cysK⁻-lacZ, kan</i>	Daßler <i>et al.</i> (2000)
BTM149	MC4100 <i>cysB(T149M)</i>	Daßler <i>et al.</i> (2000)
BTM149::λKZL300	BTM149 <i>λatt::cysK⁻-lacZ, kan</i>	Daßler <i>et al.</i> (2000)
V324Δ299	F- <i>lac galK2 galT22 recD IN(rrnD-rrnE)1</i> <i>λ⁻ rpsL179 (Str^R) ydeD::kan</i>	Daßler <i>et al.</i> (2000)
W3110	F- λ ⁻ IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 <i>rph-1</i>	Jensen (1993)
W3110ΔKM	W3110 <i>cysK::cat cysM::kan</i>	T. Maier, Consortium ^a

^a Consortium für elektrochemische Industrie GmbH, Wacker-Chemie

Tabelle 5: Verwendete Plasmide und Bakteriophagen

Plasmid / Phage	Genotyp	Referenz
<u>Plasmid:</u>		
pGP1-2	<i>kan</i> , T7 Gen 1 (RNA Polymerase)	Tabor und Richardson (1985)
pT7-4	Ap ^R , T7Φ10	Tabor und Richardson (1985)
pT7-5	Ap ^R , T7Φ10	Tabor und Richardson (1985)
pT7-5orf306	pT7-5, orf306	diese Arbeit
pATC1	pT7-5orf306, G nach C Transversion im ersten potentiellen Startcodon von orf306	diese Arbeit
pATC2	pT7-5orf306, G nach C Transversion im zweiten potentiellen Startcodon von orf306	diese Arbeit
pT7-6	Ap ^R , T7Φ10	Tabor und Richardson (1985)
pT7-6orf306	pT7-6, orf306	diese Arbeit
pACYC184-LH	<i>tet</i>	Winterhalter und Leinfelder (1997)
pKP291	pACYC184-LH, orf306 (<i>ydeD</i>) unter Kontrolle des <i>gapA</i> -Promoters P1	Daßler <i>et al.</i> (2000)
pTG29	pKP291, <i>cysEX</i>	Winterhalter und Leinfelder (1997)
pHC58	pACYC184-LH, <i>cysB</i>	T. Maier, Consortium
pHC59	pACYC184-LH, <i>cysB^c</i>	T. Maier, Consortium
pKP294	<i>tet</i> , Ap ^R , orf306 unter Kontrolle von <i>ptac</i>	C. Winterhalter, Consortium
pRS551	Ap ^R , <i>kan</i> , <i>lacZ⁺</i> , <i>lacY⁺</i> , <i>lacA⁺</i>	Simons <i>et al.</i> (1987)
pTK299	pRS551, <i>ydeD'</i> - <i>lacZ</i> Fusion	diese Arbeit
pRS552	Ap ^R , <i>kan</i> , <i>lacZ⁺</i> , <i>lacY⁺</i> , <i>lacA⁺</i>	Simons <i>et al.</i> (1987)
pTL299	pRS552, <i>ydeD'</i> - <i>lacZ</i> Fusion	diese Arbeit
pBR322	Ap ^R , <i>tet</i>	Bolivar <i>et al.</i> (1977)
pMarA	pBR322, <i>tet::marA</i>	diese Arbeit
pBRΔtet	pBR322, <i>tet</i> durch interne Deletion inaktiviert	diese Arbeit

Phage:

λ RS45	$lacZ'$, $lacY^+$, $lacA^+$, imm^{21} , ind^+	Simons <i>et al.</i> (1987)
λ TK299	λ RS45 Φ ($ydeD'$ - $lacZ'$)	diese Arbeit
λ TL299	λ RS45 Φ ($ydeD'$ - $lacZ'$)	diese Arbeit
P1kc	c	Miller (1992)

1.2. Allgemeine Nährmedien und Anzuchtbedingungen

Für die Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen wurden sowohl das LB-Vollmedium (Miller, 1992) als auch die Minimalsalzmedien M9 (Sambrook *et al.*, 1989) und SM1 (Consortium) verwendet. In diesen Medien diente Glukose (0,5 bzw. 1,5 %) als Kohlenstoffquelle. Durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar wurden die beschriebenen Medien verfestigt.

Zusammensetzung des SM1-Mediums (pH 7,0):

Salz:	[g/l]	Spurenelemente:	[mg/l]
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,0147	Na ₂ MO ₄ x 2 H ₂ O	0,15
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,7
KH ₂ PO ₄	3,0	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,25
K ₂ HPO ₄	12,0	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	1,6
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,3
NaCl	0,1		
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,002		
Na ₃ -Citrat x 2 H ₂ O	1,0		

Das SM1-Medium wurde in einigen Fällen zusätzlich mit Na₂S₂O₃ x 5 H₂O (0,4 g/l), 10% LB-Medium (v/v) und verschiedenen Aminosäuren (100 mg/l soweit nicht anders vermerkt) supplementiert. Bei Bedarf wurden außerdem Antibiotika in den üblichen Endkonzentrationen zugesetzt (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in der Regel aerob und bei 30 °C in Erlenmeyerkolben, wobei diese mit maximal einem Zehntel ihres Nennvolumens mit Medium gefüllt waren.

Das Wachstum wurde anhand der Massenzunahme durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) mit Hilfe eines Spektralphotometers (Beckman DU[®] 640) verfolgt.

2. Molekularbiologische Methoden

2.1. Oligonukleotide

In Tabelle 6 sind die verwendeten Oligonukleotide sowie deren Verwendung aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide^a

Name	Sequenz	Verwendung
TD4	5'-AAAGAT <u>C</u> AAATTCAGAGGCGGTA-3'	inverse PCR, pATC1
TD5	5'-TGTAAGCAATCAACTTAGCTGAA-3'	inverse PCR, pATC1
TD6	5'-TAGAAT <u>C</u> TCGCGAAAAGATGGGG-3'	inverse PCR, pATC2
TD7	5'-CCGCCTCTGAATTTTCATCTTTTG-3'	inverse PCR, pATC2
TD8	5'-ATCACCGAAACGCGCGAG-3'	Sequenzierung pATC1/2
TD17	5'-TCACTGAGGCAATCATGAAACCACT-3'	Test auf <i>ydeD::kan</i>
TD18	5'-AAATGGTCATAAATGGCAGCGTAGC-3'	Test auf <i>ydeD::kan</i>
TD20	5'-AACTGGCTGCGTGGTTTGT-3'	PCR, <i>marA</i>
TD21	5'-TATGCTGGATC <u>C</u> CCTGGTC-3'	PCR, <i>marA</i>
TD24	5'- <u>CGGAATT</u> C TTGTCTGTCCGGCAGTGC GTT-3'	<i>ydeD-lacZ</i> -Fusionen
TD25	5'- <u>CGGGAT</u> C CACCCCATCTTTTCGCGACAT-3'	<i>ydeD-lacZ</i> -Fusionen
REG7B	5'-CTGCAAGGCGATTAAGTTGGG-3'	Sequenzierung pTK299 und pTL299

^a Basen, die von der Wildtyp-Sequenz des jeweiligen Gens abweichen, sind unterstrichen.

2.2. Standardmethoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden molekularbiologische Standardmethoden prinzipiell entsprechend den Angaben von Sambrook *et al.* (1989), Miller (1992) oder Ausubel *et al.* (1997) durchgeführt. Dazu gehören die Präparation von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA, die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarose-Gelen sowie die enzymatische *in vitro*-Manipulation von DNA (z.B. Restriktion, Ligation, (De-)Phosphorylierung, Klenow-Behandlung), wobei hier in der Regel nach Angaben der Enzymhersteller verfahren wurde. Plasmid-DNA wurde alternativ auch mit Hilfe eines Plasmid-Isolationskits (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) isoliert.

Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und durch Ausschleudern über 100 %-Viskose-Watte von der Agarose getrennt. Das DNA-haltige Eluat wurde anschließend einmal mit Phenol/Chloroform behandelt und danach noch mit Hilfe des "PCR-Purification-Kits" (Qiagen, Hilden) gereinigt.

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm A_{260} bestimmt. Als Näherung wurde bei doppelsträngiger DNA für eine A_{260} -Einheit eine Konzentration von 50 µg/ml angenommen.

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte im Prinzip mit der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen enzymatischen Methode, jedoch unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden nach einem Protokoll der Firma Applied Biosystems GmbH (DyeTerminator Cycle-Sequenzierung mit Ampli-Taq[®]). Die Auftrennung und Analyse der auf diese Weise markierten DNA-Einzelstränge erfolgte mit Hilfe eines Sequenzautomaten (ABI Prism[™] 377 DNA Sequenzer ; Applied Biosystems GmbH / Perkin-Elmer, Warrington, GB).

2.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten oder Plasmiden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte prinzipiell nach den Angaben von Tormay (1996) in einem Personal Cycler von Biometra (Göttingen). Abweichend vom dort beschriebenen Programm wurden aber standardmäßig 29 Vermehrungszyklen durchgeführt und die Hybridisierungstemperatur wurde individuell an die T_m -Werte der Oligonukleotid-Primer angepaßt. Außerdem wurde die Goldstar-Polymerase (Eurogentec, Herstal, Belgien) im vom Hersteller gelieferten Puffer mit einer Konzentration von 0,01 U/µl verwendet.

3. Genetische Methoden

3.1. Transformation von Bakterien

Plasmide wurden entweder durch die TSS-Methode (Chung *et al.*, 1989) oder mittels Elektroporation (2000 V, 800 Ohm, 25 µF) in die entsprechenden Stämme eingebracht. Bei Klonierungen erfolgte die Transformation der Plasmide generell zuerst in den *recA*-Stamm JM109. Durch geeigneten Zusatz von Antibiotika in den üblichen Konzentrationen (Sambrook *et al.*, 1989) konnte nach Ausbringen des Transformationsansatzes auf LB-Platten auf plasmid-tragende Zellen selektiert werden.

3.2. Transduktion mit Hilfe des Bakteriophagen P1

Die Gewinnung eines P1-Lysates und die nachfolgende Transduktion des *ydeD::kan*-Allels vom Stamm V324Δ299 in den Stamm MC4100 wurde mit Hilfe des Phagen P1 entsprechend der Vorschrift von Miller (1992) durchgeführt. Die Selektion von Transduktanten erfolgte auf LB-Platten mit 50 µg/ml Kanamycinsulfat.

3.3. Integration von *lacZ*-Fusionen in das Chromosom von *E. coli*

Um die *ydeD-lacZ*-Fusionen der Plasmide pTK299 und pTL299 in das *E. coli*-Chromosom zu integrieren, wurde der Phage λ RS45 verwendet (Simons *et al.*, 1987). Nach Infektion von MC4100 pTK299 bzw. pTL299 mit λ RS45 erfolgte die Reinigung der rekombinanten Phagenlinien in MC1061. Dabei war die erfolgreiche Transduktion durch eine erworbene Kanamycin-Resistenz unter gleichzeitigem Fehlen der Ampicillin-Resistenz erkennbar. Durch UV-Bestrahlung (254 nm) wurden die Phagen wieder aus dem Chromosom freigesetzt (Silhavy *et al.*, 1984). Die so erhaltenen homogenen Phagen-Lysate wurden zur Infektion von MC4100 eingesetzt.

4. Biochemische Methoden

4.1. Analyse von Proteinen

4.1.1. Elektrophorese von Proteinen

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen wurde in 10-12,5 % Gelen entsprechend den Angaben von Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei wurde allerdings das β -Mercaptoethanol des Probenpuffers gegen 100 mM DTT ersetzt. Proteine wurden durch Anfärben mit Coomassie oder Silber (Bloom *et al.*, 1987) sichtbar gemacht.

Die Detektion von radioaktiv-markierten Proteinen erfolgte im Anschluß an die elektrophoretische Trennung durch Exposition des SDS-Gels auf einem Phosphor-Screen (Molecular Dynamics, Krefeld) und dem anschließenden Einlesen der Signale mit Hilfe eines Storm 840 PhosphorImagers (Molecular Dynamics).

4.1.2. Bestimmung des Proteingehalts von ganzen Zellen

Die Proteinbestimmung an ganzen Zellen erfolgte in modifizierter Form nach den Angaben von Schmidt *et al.* (1963). Dazu wurden 100-200 μ l der Zellsuspension abzentrifugiert, die Zellen wurden in 1 ml Wasser resuspendiert und mit 125 μ l Lösung A (16 % NaOH) versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte durch Inkubation bei 95 °C für 10 min. Nach Zugabe von 0,5 ml Lösung B (1,25 % K-Na-Tartrat; 1% NaOH; 0,25 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,625 % KJ) wurde der Ansatz bei 37 °C für 30 min inkubiert. Zelltrümmer wurden durch 20 min Zentrifugation bei 13.000 g sedimentiert. Die Extinktionsmessung des Überstandes erfolgte bei 546 nm gegen einen Reagenzienleerwert. Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichkurve mit Rinder-serumalbumin als Standard (0-1,25 mg/ml) ermittelt.

4.1.3. Radioaktive Markierung von YdeD mit dem T7-Promotor/Polymerase-System

Die gezielte radioaktive Markierung von YdeD mit [³⁵S]-Methionin erfolgte prinzipiell wie von Tabor und Richardson (1985) beschrieben. Dazu wurde der Stamm K38/pGP1-2 noch mit jeweils einem der *ydeD*-Expressionsvektoren (pT7-5orf306, pATC1 oder pATC2) transformiert. Abweichend von der Vorschrift wurde Rifampicin in einer Endkonzentration von 300 mg/l zugesetzt und die anschließende Inkubation bei 42 °C zur Induktion der T7-RNA-Polymerase wurde auf 20 min verlängert. [³⁵S]-Methionin (10 µCi) wurde schließlich zu 1 ml Kultur in einer Endkonzentration von 0,1 µM zugegeben. Nach 5 min Inkubation mit [³⁵S]-Methionin wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 100 µl Probenpuffer (Laemmli, 1970) resuspendiert.

4.1.4. Differentielle Zentrifugation

Zur Bestimmung der zellulären Lokalisation von YdeD wurden zunächst [³⁵S]-Methionin-markierte Zellen vom Stamm K38/pGP1-2/pT7-5orf306 (6-fache Menge der normalerweise für eine Markierung verwendeten Zellen, s. Abschnitt 4.1.3.) mit der 12-fachen Menge von nicht-markierten, ansonsten aber gleich behandelten Zellen gemischt. Nach dem Resuspendieren in 600 µl Aufbruchspuffer (50 mM Tris/Cl-Puffer, pH 7,5; 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 20 µg/ml PMSF) wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Die Entfernung von ganzen Zellen sowie von Zelltrümmern erfolgte durch zweimalige Zentrifugation bei 3.000 g. Der so gewonnene zellfreie Rohextrakt wurde dann zunächst für 15 min bei 30.000 g zentrifugiert. Daran anschließend folgte die Ultrazentrifugation des Überstandes (S30) bei 100.000 g für 2 h. Das Sediment (P100) dieses Schritts wurde in Aufbruchspuffer inklusive 1 M KCl resuspendiert, 45 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend erneut bei 100.000 g abzentrifugiert. Alle Sedimente (P30, P100, P100_{KCl}) wurden im gleichen Volumen Aufbruchspuffer resuspendiert wie der entsprechende Überstand.

4.2. Cystein-Bestimmung

Die Konzentration von Cystein und bestimmter Derivate in Kulturüberständen wurde entsprechend der Methode von Gaitonde (1967) bestimmt. Vor der Zugabe von Ninhydrin erfolgte allerdings die Reduktion von potentiell vorhandenem Cystin durch 10 min Inkubation in 100 mM Tris/Cl-Puffer, pH 8,5, mit 3 mM DTE. Mit dieser Prozedur wird auch das in der 2-Methyl-2,4-Thiazolidindicarbonsäure gebundene Cystein erfaßt.

4.3. Bestimmung von Aminosäuren

Die qualitative und quantitative Bestimmung verschiedener Aminosäuren in Kulturüberständen erfolgte mit Hilfe eines LC 6001 Aminosäure-Analysators (Biotronik, Puchheim). Dazu wurden die Kulturüberstände zunächst mit einer geeigneten Menge Auftragspuffer

(33,3 mM Na₃Citrat, 72,9 mM Citronensäure, 10 mM HCl, 0,5 % 2,2-Thiodiethanol, pH 2,2) verdünnt und anschließend auf die Kationenaustauschersäule des Aminosäure-Analysators aufgetragen. Nach der Auftrennung der niedermolekularen Verbindungen erfolgte die Reaktion der Aminosäuren und primären Amine mit automatisch zugeführtem Ninhydrin bei 100 °C. Der entstandene Farbstoff (Ruhemans Violett) wurde bei 570 nm detektiert. Die Art und Menge der vorhandenen Substanzen wurde durch Vergleich mit definierten Mengen von authentischen Referenzverbindungen bestimmt.

4.4. Glukose-Bestimmung

Die Bestimmung des Glukose-Gehalts von Kulturüberständen erfolgte mittels des Glukose-Bestimmungskits (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim).

4.5. Präparation von [¹⁴C]-O-Acetylserin

Die Herstellung von [¹⁴C]-O-Acetylserin aus [¹⁴C]-Serin und HCl-gesättigtem Eisessig erfolgte nach der von Kredich und Tomkins (1966) beschriebenen Prozedur.

4.6. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung (DC) von Aminosäuren erfolgte auf Kieselgel 60 DC-Platten (Merck, Darmstadt) mit folgendem Laufmittel (Kredich und Tomkins, 1966): Chloroform : Ethanol : Eisessig : H₂O = 50 : 32 : 10 : 8.

Aminosäuren wurden durch Besprühen mit Ninhydrin-Lösung (s. Abschnitt 4.2.) und anschließender Inkubation für 5 min bei 100 °C als rote Flecken sichtbar gemacht (Stahl, 1967). Zur Detektion radioaktiver Substanzen, wurde die DC-Platte auf einem Phosphor-Screen (Molecular Dynamics, Krefeld) für ca. 16 h exponiert.

5. Physiologische Methoden

5.1. β-Galaktosidase-Test

Die Messung der β-Galaktosidase-Aktivität verschiedener Stämme wurde entsprechend der Methode von Miller (1972) durchgeführt.

5.2. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Azaserin

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Azaserin erfolgte in 2 ml-Kulturen in Reagenzgläsern, in denen Azaserin entweder in LB- oder SM1-Medium in Form einer 1:2-Verdünnungsreihe vorgelegt wurde. In LB-Medium exponentiell wachsende Kulturen dienten als Inokulum. Die Azaserin-Röhrchen wurden damit entweder direkt oder nach einem

Waschschrift mit SM1-Medium auf eine OD_{600} von 0,001 angeimpft und aerob bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 20 h Inkubation.

5.3. *In vivo*-Transport von [¹⁴C]-Aminosäuren

Für die *in vivo*-Transportexperimente wurden Zellen von exponentiell wachsenden Kulturen (20 ml) geerntet, zweimal mit 10 ml Puffer A (100 mM MOPS/Tris pH 7,0; 2 mM MgSO₄; 150 µg/ml Chloramphenicol) gewaschen (Hama *et al.*, 1988) und dann mit diesem Puffer auf eine OD_{600} von 10 eingestellt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Für das Aufnahmeexperiment wurden zunächst 240 µl Puffer A inklusive 0,4 % Glukose in einem Eppendorfkegel vorgelegt. Anschließend wurden 30 µl Zellsuspension zugegeben und es wurde bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach dieser Adaptationszeit erfolgte der Reaktionsstart durch die Zugabe von 0,2 µCi [¹⁴C]-Aminosäure (30 µl). Nach bestimmten Zeiten wurden Proben à 50 µl entnommen und der Reaktionspuffer wurde durch Filtration über einen Nitrocellulosefilter mit einer Porenweite von 0,45 µm (Schleicher und Schuell, Dassel) mittels einer Nutsche von den Zellen abgetrennt. Die Filterplättchen mit den darauf befindlichen Zellen wurden in rascher Folge dreimal mit 500 µl eiskaltem Puffer A nachgewaschen, um nicht-aufgenommene, am Filter anhaftende Radioaktivität zu entfernen. Um die Menge der Radioaktivität abzuschätzen, die dennoch unspezifisch am Filterplättchen haften blieb, wurde zu einem Ansatz noch der Entkoppler Carbonylcyanid m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) ad 50 µM zugegeben, um die energieabhängige Aufnahme der Aminosäuren in die Zelle zu unterbinden. Um auch Diffusionsprozesse zu minimieren, erfolgte die Inkubation dieses Ansatzes zusätzlich im Eiswasserbad.

Nach dem Trocknen der Filterplättchen erfolgte die Messung der Radioaktivität mit Hilfe des Szintillationscocktails Ultima Gold F (Packard, Dreieich) in einem Tri-Carb 2100 TR Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard).

Zur Ermittlung der Zählausbeute bei der Szintillationsmessung wurden jeweils 10 µl des Reaktionsansatzes ohne zu filtrieren auf ein Filterplättchen gegeben und dann die darauf enthaltene Radioaktivitätsmenge bestimmt.

6. Datenverarbeitung

Die Auswertung von digitalisierten Autoradiogrammen, erfolgte mit dem Programm ImageQuant (Version 1.2, Molecular Dynamics, Krefeld). Die anschließende Bildbearbeitung wurde unter Verwendung des Programms Adobe Photoshop 2.5 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) durchgeführt.

DNA und Protein-Analysen wurden mit dem Programm Geneworks[®] 2.5 (IntelliGenetics Inc.) durchgeführt. Die Hydrophobizitätsanalyse des YdeD-Proteins nach dem Algorithmus von

Kyte und Doolittle (1982) erfolgte mit dem Programm DNA-Strider (Version 1.3, CEA, Saclay, Frankreich).

Proteine mit Ähnlichkeit zur Sequenz des YdeD-Proteins wurden mittels einer BLAST-Suche nach dem Algorithmus von Altschul *et al.* (1997) über Internet am "National Institute of Health" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) identifiziert. Das Alignment zum Vergleich verschiedener Proteinsequenzen wurde mit dem Programm MegAlign (Version 0.97, DNASTAR Inc., Madison, USA) erstellt und manuell nachbearbeitet.

Die Berechnung und Darstellung der räumlichen Struktur verschiedener Aminosäuren erfolgte mit dem Programmen ChemSketch und 3D (jeweils Version 4.02) der Firma Advanced Chemistry Development Inc. (Toronto, Kanada).

7. Bezugsquellen besonderer Chemikalien

Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) bezogen. Enzyme für die Molekularbiologie wurden bei Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), NEB (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg) oder MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) erworben. Radiochemikalien stammten von NEN Dupont (Dreiech). HCl-gesättigter Eisessig wurde vom Consortium für elektrochemische Industrie (München) zur Verfügung gestellt.

C. ERGEBNISSE

Bei der Suche zur Identifizierung neuer Gene, die zu einer verbesserten Cystein-Ausbeute eines Produktionsstammes von *E. coli* beitragen können, wurde in einem Genbank-Screening mehrfach die *mar*-Locus-Region des *E. coli*-Chromosoms (min 34) gefunden (Abb. 2). Eine genauere Analyse erbrachte jedoch, daß der dem *mar*-Locus benachbarte offene Leserahmen *ydeD* alleine zur Steigerung der Cystein-Produktion ausreichend war.

1. Charakterisierung des *ydeD*-Locus

In der Literatur wurde der Genlocus *ydeD* erstmals 1993 von Cohen *et al.* beschrieben, allerdings noch unter der Bezeichnung *orf266*. Dabei handelt es sich um einen offenen Leserahmen, der für ein putatives Protein mit 266 Aminosäuren codiert, dem aber bisher keine offensichtliche Funktion im Zusammenspiel mit den benachbarten Genen des *mar*-Locus (Resistenzvermittlung gegen verschiedene Antibiotika) zugeordnet werden konnte.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, wurde mittels Subklonierungsexperimenten *ydeD* als das Gen des *mar*-Locus identifiziert, dessen Überexpression als einziges zu einer Steigerung der Cystein-Ausbeute des Produktionsstammes führte (C. Winterhalter, Consortium, persönliche Mitteilung). Im Verlauf dieser Untersuchungen stellte sich aber überraschenderweise heraus, daß ein DNA-Fragment des von Cohen *et al.* beschriebenen *orf266* ohne dessen native 5'-Region keine verbesserte Cystein-Ausbeute mehr brachte. Erst nachdem *orf266* mit seiner eigenen 5'-Region auf dem Plasmidkonstrukt enthalten war, konnte die erhöhte Cystein-Produktion wiederhergestellt werden. Eine erneute Sequenzierung von *orf266* zeigte, daß in der von Cohen publizierten Sequenz offensichtlich ein Lesefehler vorlag, dessen Berichtigung den Leserahmen des Gens 5'-terminal um 120 Basenpaare verlängerte. Diese für ein putatives Protein mit nunmehr maximal 306 Aminosäuren codierende Sequenz wurde von Blattner *et al.* (1997) bestätigt und der Genlocus wurde mit *ydeD* (GenBank-Nummer: AE000250) bezeichnet.

1.1. Nachweis des *ydeD*-Genprodukts

Zu Beginn dieser Arbeit sollte die grundsätzliche Frage geklärt werden, ob *ydeD* in ein Genprodukt exprimiert wird und ob sich dieses in der Zelle nachweisen läßt. Dazu wurde das T7-Promotor/Polymerase-System von Tabor und Richardson (1985) gewählt, mit dessen Hilfe man ein gewünschtes Gen selektiv *in vivo* exprimieren und das Genprodukt mit [³⁵S]-Methionin markieren und somit nachweisen kann.

1.1.1. Klonierung des *ydeD*-Gens in die Expressionsvektoren pT7-5 und pT7-6

Um das *ydeD*-Gen unter die Kontrolle des T7- Φ 10-Promotors zu bringen, wurde ein 1,05 kb langes *EcoRI/BamHI*-Fragment aus dem Plasmid pKP294, das *ydeD* inklusive seiner 64 stromaufwärts gelegenen Basenpaare enthält, in die multiple Klonierungsstelle des ebenfalls *EcoRI/BamHI*-geschnittenen Expressionsvektors pT7-5 ligiert. Dabei wurde das *ydeD*-Gen in korrekter Orientierung hinter den T7- Φ 10-Promotor inseriert (pT7-5orf306, Abb. 3). Um die Abhängigkeit der Synthese des Genprodukts von seiner korrekten Lage zum T7- Φ 10-Promotor zu zeigen, wurde das gleiche *EcoRI/BamHI*-Fragment in den Vektor pT7-6 kloniert. In diesem Konstrukt liegt *ydeD* in inverser Orientierung relativ zum T7- Φ 10-Promotor vor (pT7-6orf306, Abb. 3).

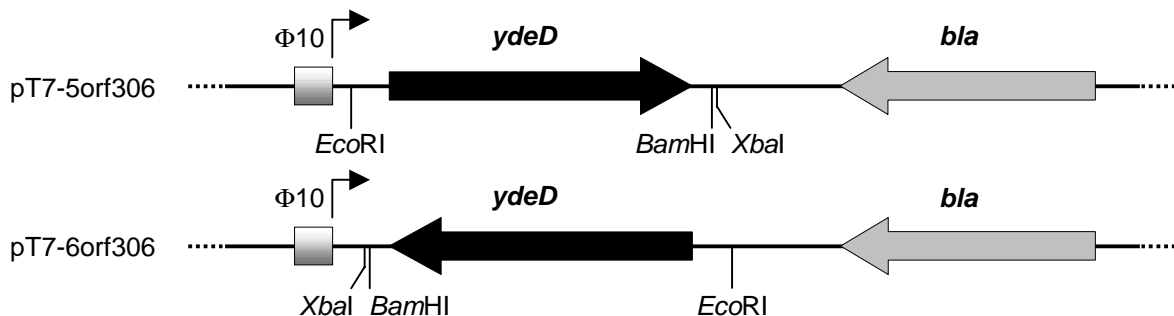


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *ydeD*-Expressionsvektoren pT7-5orf306 und pT7-6orf306.

1.1.2. Spezifische Markierung des YdeD-Proteins mit [³⁵S]-Methionin

Die spezifische *in vivo*-Markierung des *ydeD*-Genprodukts erfolgte im Stamm K38, der mit den Vektoren pT7-5orf306 bzw. pT7-6orf306 transformiert worden war. Dieser Stamm enthielt außerdem das für die selektive Genexpression nötige Plasmid pGP1-2, mit dem hitze-induzierbaren Gen für die T7-RNA-Polymerase. Als Negativkontrolle für die *ydeD*-Expression wurde der "leere" Grundvektor pT7-5 verwendet, während als System-Positivkontrolle der Vektor pT7-4 diente, bei dem das Gen der β -Laktamase (*bla*) in korrekter Orientierung zum T7- Φ 10-Promotor liegt. Dementsprechend konnte das markierte *bla*-Genprodukt in zwei Formen, der 31 kDa-Bande (unprozessierter Vorläufer) und der 29 kDa-Bande (prozessiertes Endprodukt) nachgewiesen werden (Tabor und Richardson, 1985; Abb. 4).

Die Zellen wurden nach der Markierung mit [³⁵S]-Methionin in Probenpuffer (Laemmli, 1970) resuspendiert und die anschließende Denaturierung der Proteine erfolgte einerseits durch 10 min Inkubation bei 95 °C und andererseits durch 30 min Inkubation bei 37 °C.

Während bei den Negativkontrollansätzen pT7-6orf306 und pT7-5 keine spezifische Synthese und Markierung eines Proteins erfolgte, war im Falle von pT7-5orf306 nach schonender Denaturierung der Proteine bei 37 °C eine distinkte Bande auf Höhe von etwa 23 kDa zu beobachten (Abb. 4). Ein Aufkochen der Probe hingegen bewirkte offensichtlich eine Aggregation des Proteins, was sich bei der Elektrophorese in der Ausbildung eines hochmolekularen Schmiers zeigte.

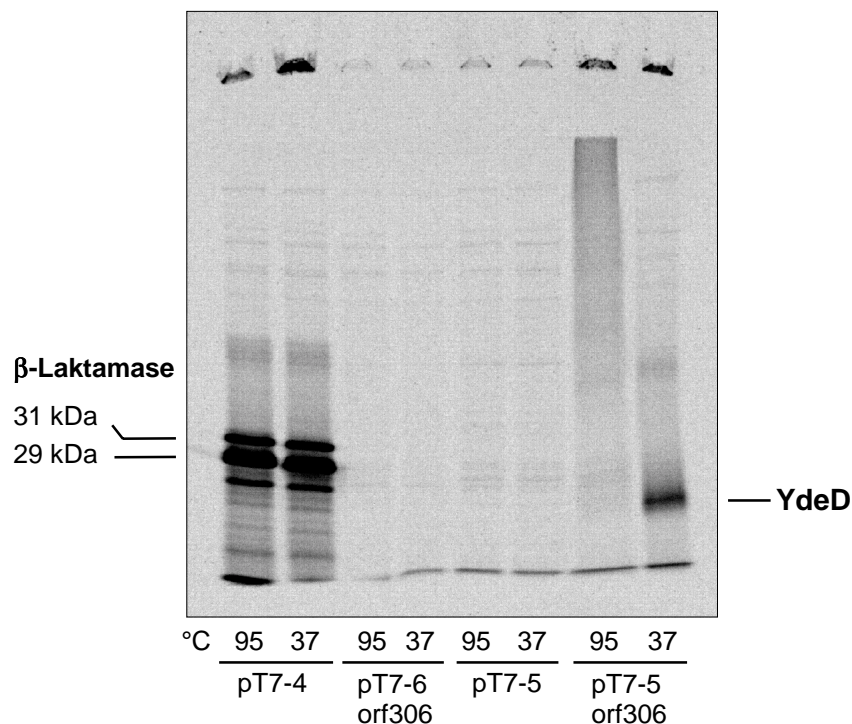


Abbildung 4: Expression des *ydeD*-Gens mit dem T7-Promotor/Polymerase-System.

Je 10 µl Zell-Lysat von [³⁵S]-Methionin-markierten Zellen wurden nach Denaturierung bei unterschiedlichen Temperaturen über ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die markierten Proteine wurden durch anschließende Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die von der Primärsequenz abgeleitete Molekülmasse für ein *ydeD*-Genprodukt mit maximal 306 Aminosäuren beträgt etwa 33 kDa. Das YdeD-Protein wandert aber im SDS-Polyacrylamidgel auf einer Höhe von ca. 23 kDa. Auf dieses aberrante Laufverhalten sowie auf das temperaturabhängige Denaturierungsverhalten von YdeD wird in Abschnitt 2 ausführlicher Bezug genommen.

1.2. Bestimmung des Translationsstartcodons des *ydeD*-Gens

Die Analyse der DNA-Sequenz im Bereich des potentiellen Initiationscodons des *ydeD*-Gens offenbarte neben dem ATG-Startcodon von orf306, dem längstmöglichen Leseraster von *ydeD*, ein weiteres putatives Startcodon im selben Leseraster sieben Basentriplets weiter

stromabwärts. Dieses "zweite" ATG besitzt eine putative ribosomale Bindestelle (AGGCGGT) (Shine und Dalgarno, 1974), die mit der entsprechenden *E. coli*-Konsensussequenz (AGGAGGT) wesentlich besser übereinstimmt, als die Sequenz stromaufwärts des ersten in Frage kommenden ATG (Abb. 5A).

Um die Frage nach dem eigentlichen Translationsstart zu klären, wurden zunächst die beiden potentiellen Startcodons von *ydeD* jeweils spezifisch derart mutiert, daß sie von den Ribosomen nicht mehr als Translationsinitiationscodons zu erkennen waren. Hierfür wurde mittels inverser PCR, unter Verwendung der Oligonukleotide TD4 und TD5 für das erste Startcodon bzw. TD6 und TD7 für das zweite Startcodon, das entsprechende ATG in ein ATC umgewandelt, wobei das Plasmid pT7-5orf306 als Matrize diente. Die Sequenzierung der auf diese Weise mutierten *ydeD*-Allele bestätigte die korrekte Einführung der jeweiligen Punktmutation. Die resultierenden Plasmide wurden mit pATC1 und pATC2 bezeichnet (Abb. 5A).

A

pT7-5orf306 (wt):

5'-T7Φ10 - (N)₆₀ - GATTGCTTACAAAAG ATG AAA TTC AGA GGC GGT AGA ATG TCG CGA AAA-3'
 M K F R G G R M S R K ...

pATC1:

5'-T7Φ10 - (N)₆₀ - GATTGCTTACAAAAG ATC AAA TTC AGA GGC GGT AGA ATG TCG CGA AAA-3'
 M S R K ...

pATC2:

5'-T7Φ10 - (N)₆₀ - GATTGCTTACAAAAG ATG AAA TTC AGA GGC GGT AGA ATC TCG CGA AAA-3'
 M K F R G G R I S R K ...

B

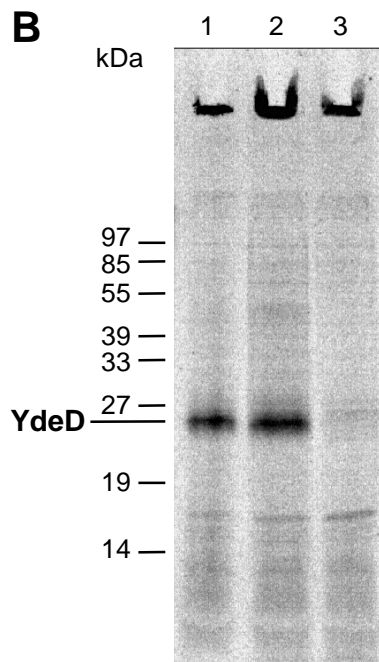


Abbildung 5: A. DNA-Sequenz der Translations-Startregion des *ydeD*-Gens. Die beiden putativen Startcodons des wt-*ydeD*-Gens in pT7-5orf306 sind unterstrichen, die potentielle Ribosomen-Bindestelle (RBS) ist durch einen Kasten markiert. Außerdem sind die DNA-Sequenzen der Translations-Startregionen der mutierten *ydeD*-Allele in pATC1 und pATC2 dargestellt. Die abgeleitete N-terminale Proteinsequenz ist unter dem jeweiligen Konstrukt angegeben. **B. Expression verschiedener *ydeD*-Allele.** Proteine wurden nach der *in vivo*-Markierung mit [³⁵S]-Methionin für 30 min bei 37 °C denaturiert und nach Auftrennung in einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel (je 10 µl Zell-Lysat) durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Spur 1: pT7-5orf306, Spur 2: pATC1, Spur 3: pATC2.

Die spezifische Synthese und die radioaktive Markierung der verschiedenen YdeD-Varianten erfolgte wieder mit Hilfe des bereits beschriebenen Systems (s. Abschnitt 1.1.2.), wobei nun als *ydeD*-Expressionsvektoren neben pT7-5orf306 auch die Derivate pATC1 und pATC2 verwendet wurden. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 5B dargestellt: Während im Falle von pATC1 weiterhin ein Produkt auf Höhe des wt-YdeD-Proteins zu beobachten ist (Spur 2), fehlt diese Bande bei pATC2 (Spur 3). Nur in letzterem Fall konnte offensichtlich aufgrund der in das zweite Startcodon eingeführten Punktmutation keine effiziente Translationsinitiation mehr erfolgen. Aus der Beobachtung, daß die Mutation des ersten ATG keinerlei Auswirkung auf die Expression von *ydeD* hat, ist zu schließen, daß es sich dabei nicht um ein von der Zelle genutztes Codon handelt. Das wiederum bedeutet, daß das zweite ATG den einzigen Translationsstart des *ydeD*-Gens darstellt, was mit der Erwartung aufgrund der besseren ribosomalen Bindestelle (Abb. 5A) gut übereinstimmt. Somit umfaßt der offene Leserahmen *ydeD* 897 Basenpaare und codiert für ein Protein mit 299 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 32,3 kDa (s. auch Abb. 25, Abschnitt 8.2.1.).

2. YdeD ist ein integrales Membranprotein

2.1. Bestimmung der zellulären Lokalisation des YdeD-Proteins

Wie in Abschnitt 1.1.2. beschrieben, zeigte YdeD im SDS-haltigen Probenpuffer ein temperaturabhängiges Denaturierungsverhalten sowie ein aberrantes Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel. Dies sind Eigenschaften, die man häufig bei extrem hydrophoben Proteinen findet (Suppmann und Sawers, 1994; Larson *et al.*, 1982; Pandan *et al.*, 1983). Daß es sich bei YdeD tatsächlich um ein äußerst hydrophobes Protein handelt, wird anhand seiner Aminosäurezusammensetzung deutlich: YdeD enthält rund 72 % aliphatische, aromatische und andere nicht-polare Aminosäuren, was die Vermutung nahelegte, daß es sich dabei um ein membrangebundenes und nicht um ein lösliches, cytoplasmatisches Protein handelt.

Eine Analyse der Proteinsequenz mit Hilfe des Algorithmus von Kyte und Doolittle (1982) zur besonderen Darstellung hydrophober Domänen von YdeD bestärkte diese Annahme (Abb. 6A): Der Hydropathieplot zeigt für das YdeD-Protein neun bis zehn potentielle Transmembranbereiche an, was dafür spricht, daß es sich um ein integrales Membranprotein handelt.

Diese Vorüberlegungen zur zellulären Lokalisation von YdeD sollten im folgenden nun auch experimentell untersucht werden. Dazu wurde das Protein erneut spezifisch radioaktiv markiert, wobei pT7-5orf306 wiederum als *ydeD*-Expressionsvektor diente. Nach dem Aufbruch der [³⁵S]-Methionin-markierten Zellen durch Ultraschallbehandlung folgten mehrere

Zentrifugationsschritte bei unterschiedlicher Beschleunigung zur Abtrennung der membran- gebundenen von den cytoplasmatischen Proteinen (s. Material und Methoden, Abschnitt 4.1.4.). Aliquots der einzelnen Fraktionen, Überstände und Sedimente, wurden im SDS- Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf das Vorhandensein von YdeD analysiert.

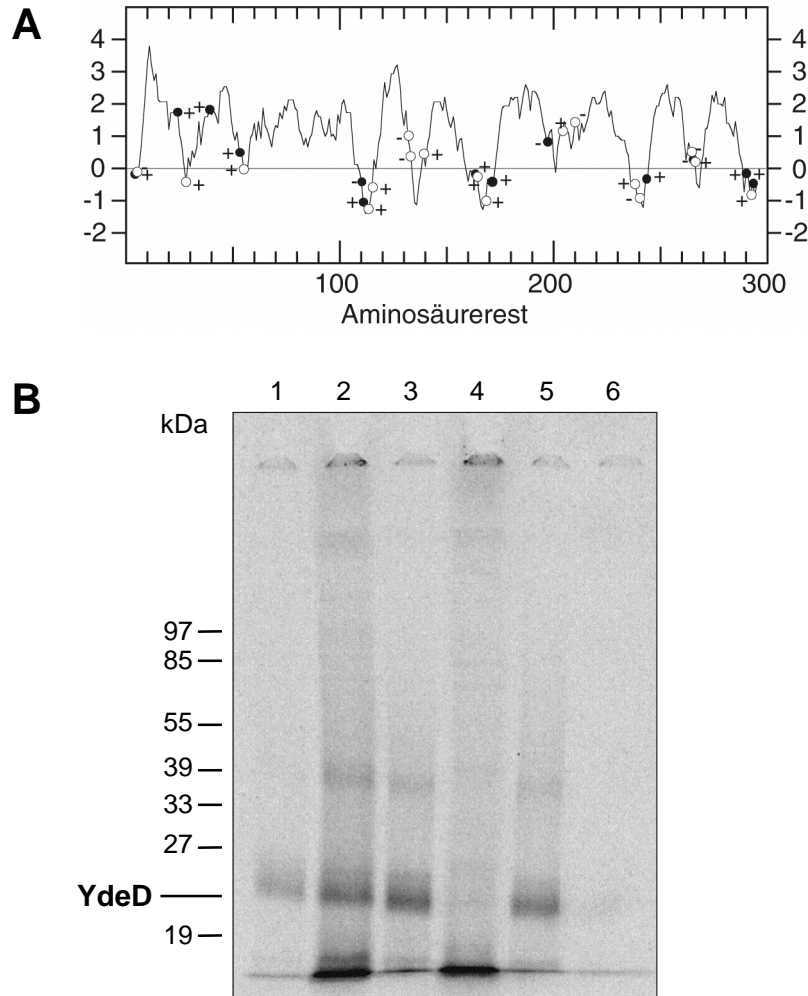


Abbildung 6: A. Hydrophobieplot von YdeD nach Kyte und Doolittle. Für die Berechnung des Hydrophobizitätsprofils wurde eine Fenstergröße von neun vorgegeben. Außerdem sind die konservierten (●) und nicht-konservierten (○) Positionen (s. Abb. 7) aller geladenen Aminosäuren von YdeD eingezeichnet. **B. Zelluläre Lokalisation von YdeD.** Die verschiedenen Fraktionen (je 15 μ l) der differentiellen Zentrifugation wurden über ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, wobei das radioaktiv-markierte YdeD-Protein nach Autoradiographie des Gels detektiert werden konnte. Spuren 1 und 2: P30 und S30; Spuren 3 und 4: P100 und S100; Spuren 5 und 6: P100_{KCl} und S100_{KCl} nach der KCl-Behandlung.

Wie in Abbildung 6B dargestellt, zeigt YdeD bei dieser differentiellen Zentrifugation das typische Verteilungsmuster für ein Membranprotein. Es ist sowohl im Sediment (P30) als auch im Überstand (S30) des Zentrifugationsschritts bei 30.000 g vorhanden (Spuren 1 und

2), aber es findet sich vollständig im Niederschlag nach Zentrifugation bei 100.000 g (P100, Spur 3). Bei dieser Beschleunigung sedimentieren Membranvesikel mit den darin eingebetteten und daran anhaftenden Proteinen.

Zur Unterscheidung, ob es sich bei YdeD um ein integrales Membranprotein handelt, oder ob es nur lose als peripheres Protein der Membran anhaftet, wurde der YdeD-haltige P100 in Gegenwart von 1M KCl inkubiert und im Anschluß daran erneut bei 100.000 g zentrifugiert. Durch die hohe KCl-Konzentration werden die ionischen Wechselwirkungen zwischen den peripheren mit den integralen Membranproteinen gestört, wodurch periphere Proteine von der Membran abgelöst werden und somit bei der erneuten Zentrifugation nicht mehr sedimentieren. Wie zu beobachten (Spuren 5 und 6), läßt sich YdeD aber offensichtlich nicht durch diese Behandlung von der Membran ab- oder herauslösen, was den Schluß zuläßt, daß es sich um ein integrales Membranprotein handelt.

Ob YdeD allerdings in der cytoplasmatischen oder in der äußeren Membran lokalisiert ist, kann durch dieses Experiment nicht entschieden werden, da bei der Aufarbeitung der Zellen keine Trennung der beiden Membrantypen erfolgte. Allerdings besitzt der N-Terminus von YdeD nicht die charakteristischen Merkmale der Signalsequenz von sekretierten Proteinen (Pugsley, 1993), so daß angenommen werden darf, daß YdeD in der cytoplasmatischen und nicht in der äußeren Membran lokalisiert ist.

2.2. Einordnung von YdeD in eine neue Familie von Membranproteinen

Eine BLAST-Suche nach Proteinen mit Ähnlichkeiten zur YdeD-Primärsequenz ergab, daß YdeD zur PecM-Familie gehört, welche eine Reihe von hypothetischen Membranproteinen umfaßt (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?upflist.txt>). Bei PecM, dem bisher einzigen zumindest ansatzweise charakterisierten Mitglied und Namensgeber dieser Familie, handelt es sich um ein Membranprotein mit der putativen Funktion eines Signalrezeptors und Transduktors bei der Expressionsregulation verschiedener Virulenzgene von *Erwinia chrysanthemi* (Reverchon *et al.*, 1994). Die Sequenzübereinstimmung zwischen YdeD und PecM beträgt etwa 22%. Die höchste Ähnlichkeit mit ca. 70% Sequenzidentität findet man jedoch zwischen YdeD und einer Teilsequenz von OrfA des *mar*-locus von *Salmonella typhimurium* (Sulavik *et al.*, 1997). Ein hypothetisches Protein (DR0135, GenBank-Nummer: AE001876) des jüngst sequenzierten Gram-positiven Bakteriums *Deinococcus radiodurans* (White *et al.*, 1999) zeigt 41% Sequenzidentität zu YdeD (Abb. 7). Die nächstbesten Homologien findet man bei den zwei putativen Proteinen, YoaV und YvbV, von *Bacillus subtilis* (GenBank-Nummern: AF027868 bzw. Z99121) und AF0266 von *Archaeoglobus fulgidus* (SWISSPROT-Nummer: 029973) (Abb. 7). Alle zeigen Sequenzidentitäten von 25-28% und Sequenzähnlichkeiten von ca. 45% zu YdeD.

Eine genauere Analyse ergab, daß speziell die Positionen von geladenen Aminosäuren in YdeD konserviert sind (Abbn. 6A und 7), was auf ihre entscheidende Funktion für die Topologie des Proteins in der Membran und/oder ihre mögliche Beteiligung an der Bindung und dem Transport von geladenen Molekülen wie z. B. Aminosäuren hindeutet.

YdeD	E. c.	-----MSRKDGV LALLVVVVWGLNFVVIKVGLHNMPPLMLAGLRFMLVA--FPAIF	49
DR0135	D. r.	MSASAPASPLNARSLGLALLITLIWGVNFVVIKWSVAGASPLLVAALRFLLAA--FPAVL	58
YoaV	B. s.	-----MVKVMLGIISVTLI WGYTWVAMKVG IHDIPPLLFSGIRLFIGAVPLFLIL	50
YvbV	B. s.	-----MKQLPKTRTALLLAF LVMWGVNWP LSKAALAYSPP L LFAGIRTLIGGLLLVIVA	55
AF0266	A. f.	-----MKKWIVLALT VTFWGLAFTA IKYSVRFLSP IAIASLRF A IANTLFAVII	49
YdeD	E. c.	FVARPKVPLN-LLLGYGLTISFAQFAFLFCAINFGM---PAGLASLVLQAQAFFTIMLGA	105
DR0135	D. r.	FVPRPTIAP-RLLWGYGLAVGV MQFGLLYLAIQLGM---SAGMGSLLMQTQAFFTALLAA	114
YoaV	B. s.	FIQRKKLSIQKEHLKSYIIMSLLMGLGYMGILTYGMQFVDSGKTSVLVYTMPIEVTVISH	110
YvbV	B. s.	LPRIHKLR L-KETWPIYLVSALLNITLFYGLQTI GLNYPAGLFS AIVFQPVL MGVFVSW	114
AF0266	A. f.	ILGKR-IKW-KDL-PKVFALGIFGVS VYHVFLNLGEVYISSGVASVVISLAPIEVLILSA	106
YdeD	E. c.	FTFGERLHGKQLAGIALAIFGVLVLIEDS-LNGQHVAMLGFM LTLAAAFSWACGNIFNKK	164
DR0135	D. r.	RFFGEEKVMPWQAAGITLA-FGGMALIGLT--AGHDVPPFP LLLTLTAALGW AISNLVVK-	170
YoaV	B. s.	FSLNEKMN VYKTMGLVCGLFGLLFI FGKEMLNIDQSALFGELCVLVAALSWGIANVFSKL	170
YvbV	B. s.	LWLGESMFVMKVI GLILGFAGVAVISAAGF--GGHISVIGVLLALGSAVSWALGTVYMKK	172
AF0266	A. f.	IFLRE RITYSKVVGIIIAFLGVVVISEPSYANIYGI ALV-MVSTVAAA IYTFGKSLLS-	164
YdeD	E. c.	IMSHSTRPAVMSLV IWSALIP IIPFFVASLILDGSATMIHSLVTIDMTTILSLMYLAFVA	224
DR0135	D. r.	---ASPQANGFGLV VWSALIPPIPLALLAGLTAGWGPVMQTLTHSDWKFWAAVLFMGLGN	227
YoaV	B. s.	QFK---HIDI IHMNAWHLMMGAVMLLVFSFIFEAVPSA-----EWTYQAVWSLLFNGLLS	222
YvbV	B. s.	--TGS-RVDSIWMVALQ LTI GSVFLLISGFWTESFS AI-----QWTAPFITSLLEISV FV	224
AF0266	A. f.	-----KYNPITL TSNAMVLGSIPL--YPFLPDSIRSL-----GGDLNLIGSIVFLGIFS	211
YdeD	E. c.	TIVGYGIWGTLLGRYETWRVAPLSLLVPV VGLASAALLLDERLTGLQFLGAVLIMTGLYI	284
DR0135	D. r.	TVLGFGLIWSGLIQRHGASRVAPLSLLVPV FGTLASALAFHEGFPPGKVLGAALIAAGLVL	287
YoaV	B. s.	TGFTFVVWFVVLNQIQASKASMALMFVPV LALFFGWQLHEQITINIILGALLICCGIFM	282
YvbV	B. s.	IATGWL VFFTLVGSGEASKVAS YTFLIPLISIVASSIFLHEPLT LSLLAGLLIVTSICL	284
AF0266	A. f.	TFFGYLGWYYFLEKEEASRASVFLLAIPVVSLLLAGNILLAEPLTLRTVAGSGLVLLGIYI	271
YdeD	E. c.	NVFGLRWRKAVK VGS	299
DR0135	D. r.	HVFGGRWWRGAASQGLGRAQAEGRETYPPDNADGLEDR	325
YoaV	B. s.	NTFTFSRRKV	292
YvbV	B. s.	VNTKSKAQKAAAIGINEKAAQ	305
AF0266	A. f.	VVRK-R	276

Abbildung 7: Sequenzvergleich von YdeD mit Mitgliedern der PecM-Familie. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, wenn sie in mindestens vier Sequenzen konserviert sind. Hinsichtlich ihrer Struktur oder Größe ähnliche Aminosäuren sind grau-schattiert dargestellt, wenn sie in mindestens drei Sequenzen vorhanden sind. Die Pfeile markieren die Positionen der konservierten geladenen Reste in YdeD. A. f., *Archaeoglobus fulgidus*; B. s., *Bacillus subtilis*; D. r., *Deinococcus radiodurans*; E. c., *Escherichia coli*.

3. Phänotypische Charakterisierung eines *E. coli*-Wildtypstammes bei YdeD-Überproduktion

Die Bestimmung der zellulären Lokalisation des YdeD-Proteins ließ eine erste Vermutung über dessen Aktivität im Cystein-Fermentationsprozeß zu: YdeD könnte als integrales Membranprotein möglicherweise am Efflux des Cysteins beteiligt sein und so zu einer verbesserten Ausbeute führen. Diese These wurde im weiteren Verlauf durch eine Reihe von physiologisch ausgerichteten Experimenten untersucht.

3.1. Cystein-Exkretion bei YdeD-Überproduktion in einem *E. coli*-Wildtypstamm

Die Überexpression des *ydeD*-Gens in einem Cystein-Produktionsstamm, bei dem die Cystein-Biosynthese dereguliert ist, führt zu einer deutlichen Steigerung der Cystein-Ausbeute. Um nun den physiologischen Beitrag des Membranproteins YdeD in diesem Prozeß eindeutig identifizieren zu können, mußte dieses komplexe System möglichst vereinfacht werden. Dazu bot es sich an, den Effekt der YdeD-Überproduktion in einem Wildtypstamm von *E. coli*, dessen Cystein-Biosynthese normal reguliert ist und der dementsprechend auch kein Cystein ausscheidet, näher zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde der *E. coli*-Wildtypstamm W3110 mit dem *ydeD*-Expressionsvektor pKP291 transformiert. Auf diesem Plasmid mit mittlerer Kopienzahl (ca. 15-20 pro Zelle) befindet sich das *ydeD*-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven P1 Promotors von *gapA* (Charpentier und Branlant, 1994), dem Gen für die D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase von *E. coli*. Als Kontrolle diente W3110 mit dem leeren Grundvektor pACYC184-LH. Um zu untersuchen, ob die *ydeD*-Überexpression auch in einem Wildtypstamm einen meßbaren Phänotyp besitzt, wurde der YdeD-überproduzierende Stamm W3110 pKP291 zunächst jeweils hinsichtlich des Wachstums sowie der Cystein-Exkretion mit dem Kontrollstamm verglichen. Dazu war dem SM1-Minimalsalzmedium, das auch 10% LB-Medium (v/v) enthielt, noch wahlweise Thiosulfat zugesetzt worden, da dies zumindest im Produktionsstamm zu einer verbesserten Cystein-Ausbeute führt (T. Maier, Consortium, persönliche Mitteilung).

Die Kontrollkulturen zeigten sehr gutes und von der verfügbaren Schwefel-Quelle (S-Quelle) unabhängiges Wachstum (Abb. 8A). Die maximale Zelldichte des YdeD-überproduzierenden Stammes lag hingegen merklich niedriger als bei den Kontrollkulturen und es war außerdem eine deutliche Abhängigkeit des Wachstums von der S-Quelle zu beobachten. Mit Thiosulfat als zusätzlicher S-Quelle konnte das schlechte Wachstum mit Sulfat als primärer S-Quelle deutlich verbessert werden.

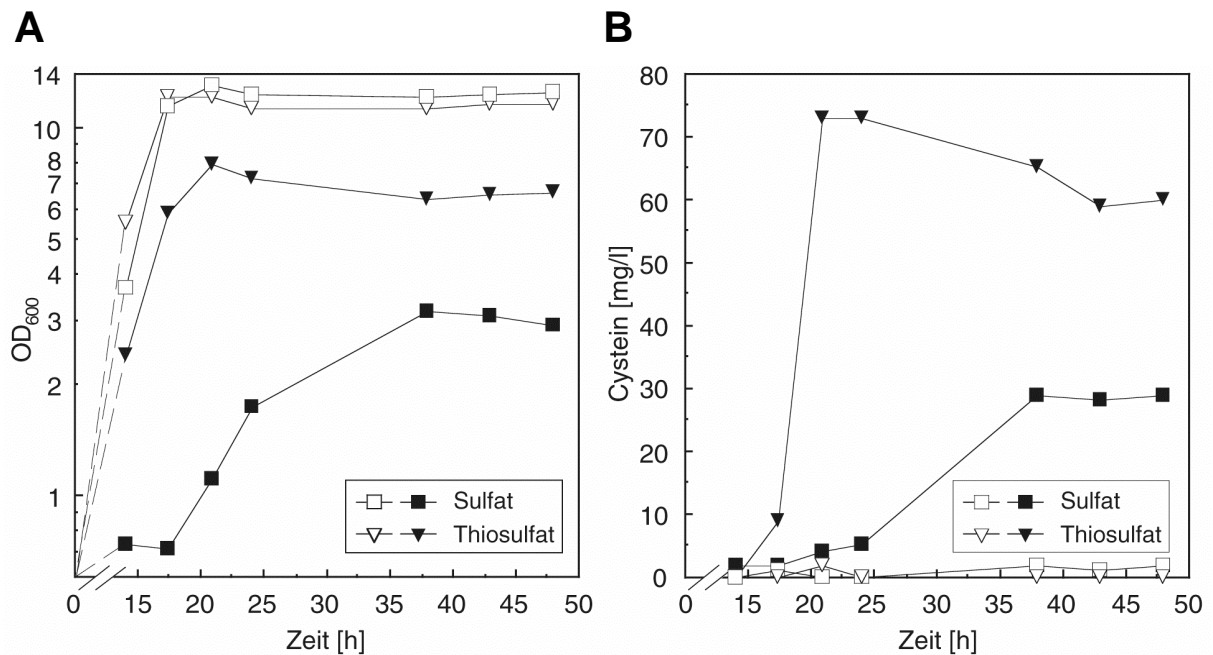


Abbildung 8: Wachstum (A) und Cystein-Exkretion (B) des *E. coli*-Wildtypstammes W3110 bei YdeD-Überproduktion. Die Anzucht der Zellen mit dem Plasmid pKP291 (gefüllte Symbole) bzw. pACYC184-LH (offene Symbole) erfolgte zunächst in LB-Medium. Diese Kulturen wurden in der spät-exponentiellen Phase 1:500.000 in SM1-Medium mit 10% LB-Anteil und wahlweise zugesetztem Thiosulfat (8 mM) übergeimpft. Die Cystein-Bestimmung erfolgte mit dem sauren Ninhydrinreagenz.

Eine Analyse der Kulturüberstände mit dem sauren Ninhydrinreagenz zum spezifischen Nachweis von Cystein zeigte, daß YdeD-überproduzierende Wildtypzellen offensichtlich beträchtliche Mengen dieser Aminosäure (> 70 mg/l) ausscheiden können (Abb. 8B). Auch hier war ein Unterschied zwischen den mit Sulfat und den mit Thiosulfat gewachsenen Kulturen zu beobachten. Bezieht man allerdings die Cystein-Konzentration auf die jeweilige Zelldichte, erhält man für beide Kulturen etwa vergleichbare Werte, was bedeutet, daß primär das Wachstum und nur sekundär die Cystein-Exkretion bei YdeD-Überproduktion von der S-Quelle abhängt. In den Kulturüberständen der Kontrollzellen war wie erwartet zu keinem Zeitpunkt des Wachstums Cystein nachweisbar.

Vergleichbare Ergebnisse bezüglich Wachstum und Cystein-Exkretion wurden auch mit anderen *E. coli*-Wildtypstämmen wie MC4100 und KL19 bei *ydeD*-Überexpression erzielt. Hier war ebenfalls eindeutig Cystein im Kulturüberstand nachweisbar, allerdings lag die maximale Cystein-Konzentration etwa um den Faktor 2 bzw. 4 niedriger als bei W3110 (Daten nicht gezeigt).

3.2. Abhängigkeit des Wachstums von der Schwefel-Quelle

Nachdem im vorher beschriebenen Experiment beobachtet worden war, daß offenbar der Reduktionszustand des Schwefels in der angebotenen S-Quelle einen entscheidenden Einfluß auf das Wachstum von YdeD-überproduzierenden Zellen hat, wurde das Wachstumsverhalten nochmals etwas eingehender untersucht, wobei diesmal das Spektrum der verschiedenen S-Quellen erweitert wurde. Dabei war mit Ausnahme eines Ansatzes auf den Zusatz von 10% LB-Medium verzichtet worden, um unter genau definierten Bedingungen die Abhängigkeit des Wachstums von der S-Quelle testen zu können.

Im Falle von Sulfat als einziger S-Quelle, in der der Schwefel in seiner höchstmöglichen Oxidationsstufe (+VI) vorliegt, war überhaupt kein Wachstum zu beobachten (Abb. 9). Wurde Schwefel in einem reduzierteren Zustand, beispielsweise in Form von Thiosulfat oder schon organisch gebunden im Methionin, angeboten, führte dies zu einer mäßigen Verbesserung des Wachstums. Wurden dagegen Thiosulfat und Methionin gemeinsam gefüttert, konnte das Wachstum nahezu vollständig wiederhergestellt werden. Derselbe Effekt war auch nach Supplementierung mit Cystin zu beobachten. Cystin kann intrazellulär zu Cystein reduziert werden und stellt dann in dieser Form den primären S-Donor für weitere S-haltige Verbindungen der Zelle dar (Übersicht in Kredich, 1996). Auch der Zusatz von LB-Medium konnte das Wachstum zumindest etwas fördern (vgl. Abb. 8A), da im Pepton-Anteil ebenfalls die Aminosäuren Methionin (ca. 50 mg/g Pepton) und Cystin (ca. 2,5 mg/g Pepton) enthalten sind. Besonders aber der Cystin-Gehalt im LB-supplementierten SM1-Medium lag mit 0,01 mM deutlich niedriger als im Vergleich zu dem Ansatz, in dem reines Cystin als ergänzende S-Quelle (ad 0,5 mM) zugesetzt wurde.

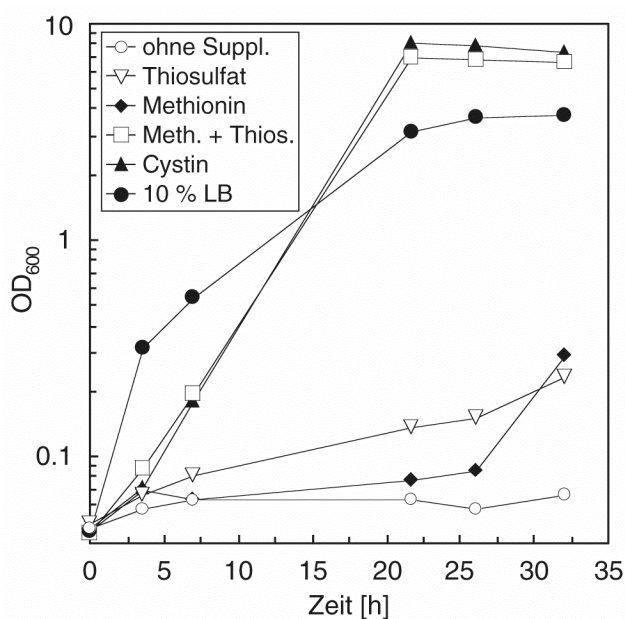


Abbildung 9: Wachstum von W3110 pKP291 in Minimalmedium mit verschiedenen S-Quellen. Eine in LB-Medium angezogene Vorkultur wurde in der exponentiellen Phase geerntet und in SM1-Medium mit Sulfat als basaler S-Quelle überimpft. In verschiedenen Ansätzen erfolgte der Zusatz von wahlweise Thiosulfat (1,6 mM), Methionin (0,66 mM), Cystin (0,5 mM) oder LB-Medium (10%) als ergänzende S-Quelle.

3.3. Induktionsstatus des Cystein-Regulons bei YdeD-Überproduktion

Die beschriebene Abhängigkeit des Wachstums von der Qualität der verfügbaren S-Quelle und das Vorhandensein von Cystein im Medium deuteten daraufhin, daß die Überproduktion von YdeD in irgendeiner Form den normalerweise ausgeglichenen Schwefelmetabolismus der Zellen beeinflusst. Der Befund, daß mit Sulfat als einziger S-Quelle das Wachstum nicht möglich war, mit reduzierten S-Verbindungen hingegen schon, ließ vermuten, daß die Zellen den Sulfat-Schwefel nicht ausreichend zu Sulfid reduzieren können. Dies wiederum könnte an einer mangelnden Induktion der Gene des Cystein-Regulons durch den Transkriptionsaktivator CysB liegen (vgl. Einleitung, Abschnitt 3.2.1.). Wenn diese Annahme richtig ist, so sollte der Austausch des *cysB*-Gens gegen ein mutiertes Allel, das eine konstitutive Induktion des Cystein-Regulons bewirkt und damit zu einem dauerhaft exprimierten Sulfat-Reduktionsweg führt, das Wachstum mit Sulfat ermöglichen bzw. verbessern können.

3.3.1. Wachstum bei unterschiedlicher Induktion des Cystein-Regulons

Um die oben genannte Hypothese zu testen, wurde der Stamm BTM149 verwendet, der anstelle des Wildtypgens das mutierte *cysB*-Allel *cysB^c* trägt. Im Unterschied zum Wildtyp-CysB des *E. coli*-Stammes MC4100 ist im CysB^c-Protein von BTM149 der Threonin-Rest an Position 149 gegen ein Methionin ausgetauscht; diese Mutation wandelt das CysB-Protein von *S. typhimurium* bekanntermaßen in einen konstitutiven, nicht mehr von der S-Quelle abhängigen Transkriptionsaktivator des Cystein-Regulons um (Colyer und Kredich, 1994). Daß dies auch für das CysB-Protein von *E. coli* zutrifft, wird anhand der Daten von Tabelle 7 (s. Abschnitt 3.3.2.) deutlich.

Im folgenden Experiment wurde der CysB^c-Stamm BTM149 mit dem ansonsten isogenen CysB-Wildtypstamm MC4100 hinsichtlich seines Wachstumsverhaltens bei YdeD-Überproduktion in Medien mit verschiedenen S-Quellen verglichen.

Dabei verhielt sich BTM149 pKP291 auch mit Sulfat als primärer S-Quelle in allen Wachstumsphasen genau wie bei Supplementation mit Thiosulfat oder Cystin (Abb. 10A). Demgegenüber zeigte der CysB-Wildtypstamm MC4100 pKP291 bei Wachstum auf Sulfat ein auffälliges Verhalten (Abb. 10B): In den ersten Stunden nach Überimpfen von LB-Vollmedium in das SM1-Medium wuchsen die Zellen noch vergleichbar gut wie in den Anzuchten mit Thiosulfat oder Cystin. Dann allerdings verlangsamte sich das Wachstum deutlich und es war über mehrere Stunden kaum eine Zunahme der Zellmasse zu beobachten. Nach weiterer Inkubation erreichte die Kultur dann aber schließlich eine Zelldichte, die mit der von auf Thiosulfat bzw. Cystin gewachsenen Kulturen vergleichbar war.

Parallel zu den oben beschriebenen Anzuchten wurde als Kontrolle auch das Wachstum der Stämme MC4100 und BTM149 auf den verschiedenen S-Quellen jeweils ohne YdeD-Überproduktion (mit pACYC184-LH) verglichen. Bei beiden Stämmen war aber kein Unterschied im Wachstumsverhalten bezüglich der S-Quelle oder der verschiedenen *cysB*-Allele zu beobachten (Abb. 10A und B).

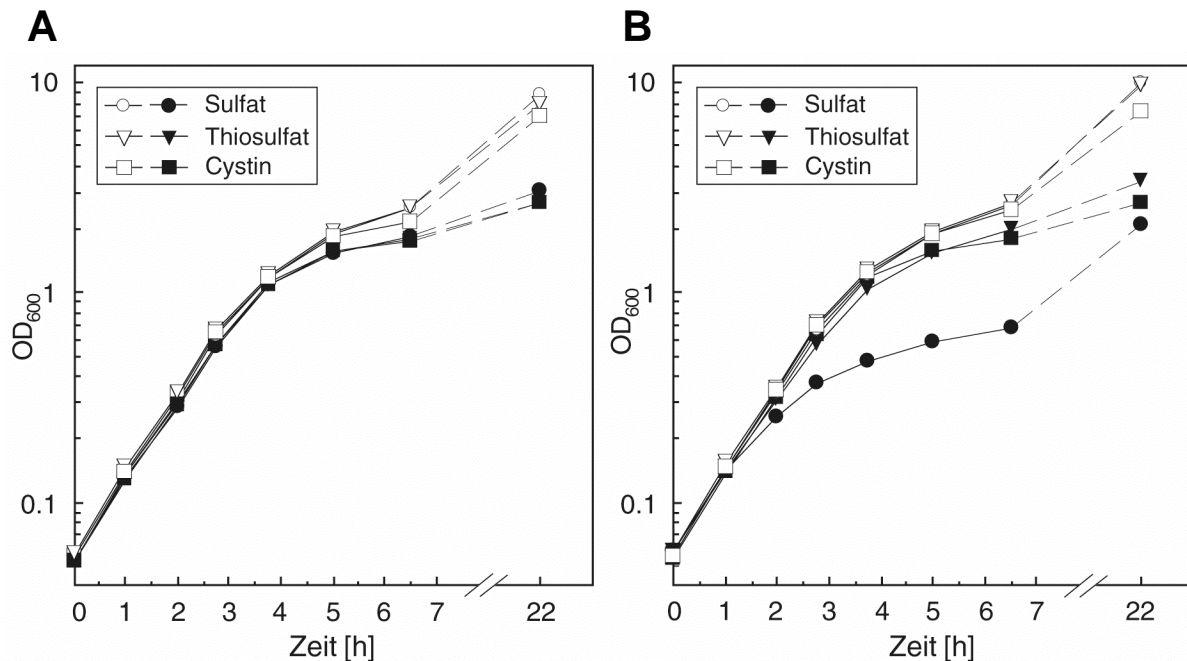


Abbildung 10: Abhängigkeit des Wachstums von der S-Quelle von Stämmen mit verschiedenen *cysB*-Allelen. Kulturen der Stämme BTM149 (A) und MC4100 (B) mit den Plasmiden pKP291 (gefüllte Symbole) bzw. pACYC184-LH (offene Symbole) wurden zunächst in LB-Medium angezogen, in der exponentiellen Phase geerntet und dann in SM1-Medium (inklusive 10% LB-Anteil), das wahlweise noch mit Thiosulfat (1,6 mM) oder Cystin (0,5 mM) supplementiert worden war, überimpft.

Durch den Befund, daß YdeD-überproduzierende Zellen mit Hilfe des konstitutiven Transkriptionsaktivators CysB^C auf Sulfat ebenso gut wachsen können wie auf Thiosulfat oder Cystin, wurde die eingangs aufgestellte These bestätigt: Die Ursache für das schlechte Wachstum auf Sulfat von YdeD-überproduzierenden CysB-Wildtypzellen liegt offenbar in der unzureichenden Induktion des Cystein-Regulons und der daraus resultierenden mangelnden Fähigkeit zur Reduktion von Sulfat.

3.3.2. Bestimmung des Induktionsstatus' des Cystein-Regulons

Die Beobachtung, daß bei YdeD-Überproduktion das Cystein-Regulon in Wildtypstämmen für das Wachstum mit Sulfat nicht ausreichend induziert ist, sollte mit dem folgenden Experiment noch etwas detaillierter untersucht und vor allem quantifiziert werden. Zu diesem

Zweck wurde eine *cysK'*-*lacZ*-Translationsfusion verwendet, da mit diesem Konstrukt eine exakte Messung des Induktionsniveaus eines zentralen und damit repräsentativen Gens des Cystein-Regulons möglich war. Diese Reporter-gen-Fusion war in die λ -Integrationsstelle des Chromosoms der Stämme MC4100 und BTM149 eingeführt worden (Daßler *et al.*, 2000). Die resultierenden Stämme MC4100:: λ KZL300 und BTM149:: λ KZL300 wurden mit den Plasmiden pKP291 bzw. pACYC184-LH transformiert; nach Anzucht in SM1-Medium, das wie im vorhergehenden Wachstumsexperiment (s. Abschnitt 3.3.1.) verschiedene S-Quellen enthielt, erfolgte die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität (Tab. 7).

Tabelle 7: Einfluß der YdeD-Überproduktion auf das Expressionsniveau einer *cysK'*-*lacZ*-Fusion

Stamm / Plasmid	Relevanter Genotyp Chromosom ^a / Plasmid	β -Galaktosidase-Aktivität [Miller-Einheiten]		
		Schwefel-Quelle		
		Sulfat	Thiosulfat	Cystin
MC4100:: λ KZL300 / pACYC184-LH	<i>cysB</i> ^{wt} / -	3000 \pm 230	1310 \pm 50	570 \pm 40
MC4100:: λ KZL300 / pKP291	<i>cysB</i> ^{wt} / <i>ydeD</i>	380 \pm 20 ^b	660 \pm 30	500 \pm 30
BTM149:: λ KZL300 / pACYC184-LH	<i>cysB</i> ^c / -	2910 \pm 200	2600 \pm 190	2880 \pm 370 ^c
BTM149:: λ KZL300 / pKP291	<i>cysB</i> ^c / <i>ydeD</i>	2960 \pm 170	2720 \pm 470	2630 \pm 60 ^c

Die Anzucht erfolgte genau wie in der Legende von Abbildung 10 beschrieben, wobei die Zellen während des exponentiellen Wachstums (OD₆₀₀ 0,6 - 0,9) für die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität geerntet wurden. Es sind jeweils die Durchschnittswerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

- Sowohl MC4100:: λ KZL300 als auch BTM149:: λ KZL300 tragen eine Kopie des *ydeD*-Wildtyp-Allels auf dem Chromosom.
- Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 0,25 - 0,4 geerntet als noch deutliches Wachstum meßbar war.
- Mittelwert von nur 2 Experimenten.

Wie erwartet, ist in den *CysB*-Wildtypzellen ohne *YdeD*-Überproduktion die Expression der Reporter-gen-Fusion bei Wachstum auf Sulfat am höchsten (Wheldrake, 1967), woraus man schließen kann, daß unter diesen Bedingungen das Cystein-Regulon allgemein und damit auch die Expression der Gene, die für das Sulfat-Aufnahmesystem (*cysPTWA* und *sbp*) und die Sulfat-Reduktionsmaschinerie (*cysDNC* und *cysJIH*) codieren, stark induziert sind. Bei Wachstum auf Cystin ist das Cystein-Regulon kaum induziert, was darauf beruht, daß die

Serintransacetylase (CysE) durch Cystein gehemmt wird (Denk und Böck, 1987) und damit der Acetylserin-Spiegel in der Zelle für eine effektive Induktion zu gering ist. Thiosulfat bewirkt über den Regulationsmechanismus der Anti-Induktion (Hryniewicz und Kredich, 1991) eine intermediäre Expression der *cysK'*-*lacZ*-Fusion.

Die Überproduktion von YdeD führt bei den CysB-Wildtypzellen teilweise zu einer dramatischen Reduktion der Induktion des Cystein-Regulons: Das Expressionsniveau der Reporter-gen-Fusion liegt hier im Vergleich zu den Kontrollzellen bei Wachstum mit Sulfat etwa achtfach, mit Thiosulfat etwa zweifach niedriger (Tab. 7).

In den CysB^c-Stämmen ist das Cystein-Regulon immer voll induziert (vergleichbar mit dem Niveau des CysB-Wildtypstammes auf Sulfat) und damit unabhängig sowohl von der S-Quelle als auch von der YdeD-Überproduktion, ähnlich wie es für einen entsprechenden Stamm von *S. typhimurium* beschrieben wurde (Colyer und Kredich, 1994).

Durch dieses Experiment wurde die Hypothese, daß das Cystein-Regulon in CysB-Wildtypstämmen bei YdeD-Überproduktion nicht induziert ist (s. Abschnitt 3.3.1.), bestätigt. Die Ursache hierfür ist offenbar ein intrazellulärer N-Acetylserin (NAS)-Mangel dieser Zellen, was daran deutlich wird, daß in den Zellen der Stämme BTM149 und BTM149::λKZL300, in denen das mutierte CysB^c-Protein nicht mehr auf den Coinduktor N-Acetylserin angewiesen ist, das Cystein-Regulon auch trotz YdeD-Überproduktion induziert werden kann.

3.3.3. Zeitlicher Verlauf der Induktion des Cystein-Regulons

Es war beobachtet worden, daß YdeD-überproduzierende Wildtypzellen, bei Kultivierung mit Sulfat und 10% LB-Medium als einzigen S-Quellen, nach einer zwischenzeitlichen lag-Phase, in der das Cystein-Regulon aufgrund des NAS-Mangels nicht induziert ist (s. Tab. 7), wieder zu wachsen begannen (s. Abb. 10B). Dies setzt allerdings die Fähigkeit zur Sulfat-Reduktion voraus, was wiederum bedeutet, daß das Cystein-Regulon zu einem späteren Zeitpunkt wieder induziert gewesen sein muß. Um diese These zu prüfen, wurde der Induktionsstatus des Regulons während verschiedener Wachstumsphasen bestimmt.

Kulturen von MC4100::λKZL300 pKP291 wurden entweder mit Sulfat, Thiosulfat oder Cystin angezogen und der zeitliche Verlauf der Expression der *cysK'*-*lacZ*-Fusion in den verschiedenen Wachstumsphasen verfolgt. Wie schon in Tabelle 7 dargestellt, liegt das Induktionsniveau bei Wachstum mit Sulfat zunächst noch niedriger als bei Wachstum mit Thiosulfat oder Cystin (Abb. 11). Nach 23 h aber, einem Zeitpunkt, zu dem die auf Sulfat gewachsene Kultur eine mit den anderen Kulturen vergleichbare Zelldichte erreicht hatte, lag die Induktion des Cystein-Regulons nun um etwa den Faktor vier höher als in der zwischenzeitlichen lag-Phase. Dieser Wert (ca. 1300 Miller-Einheiten) entspricht etwa dem Induktionsniveau von auf

Thiosulfat gewachsenen Wildtypzellen ohne YdeD-Überproduktion (s. Tab. 7) und ist offenbar für eine effiziente Sulfat-Reduktion ausreichend.

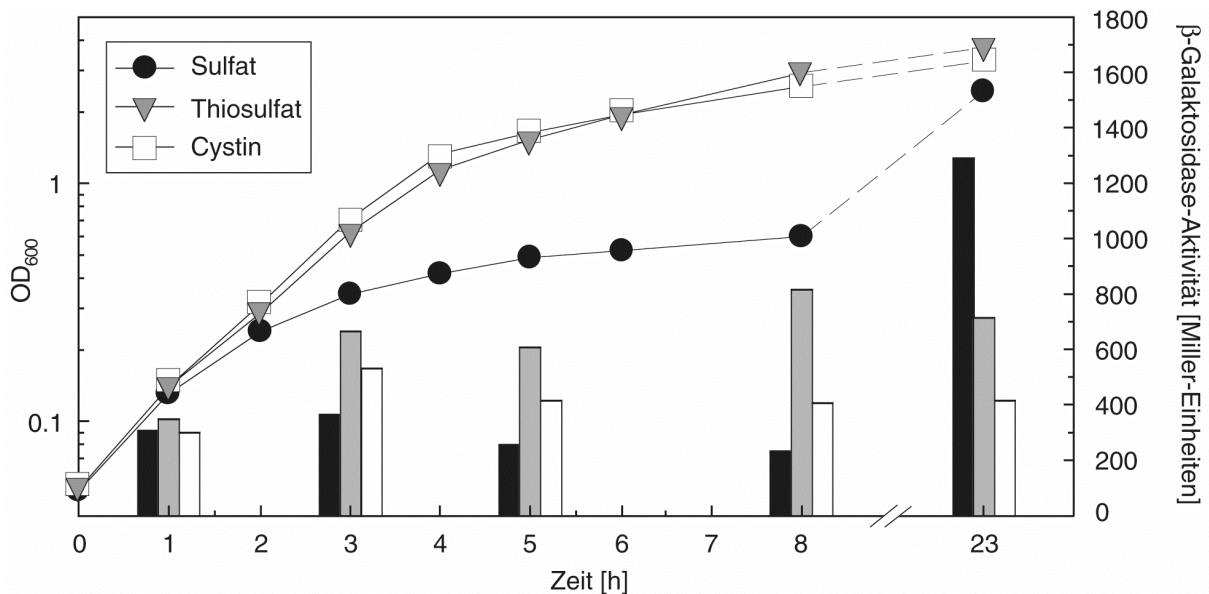


Abbildung 11: Induktionsstatus des Cystein-Regulons im zeitlichen Verlauf. Kulturen des Stammes MC4100::λKZL300 pKP291 wurden wie in der Legende zu Abbildung 10 beschrieben in SM1-Medium mit verschiedenen S-Quellen angezogen. Die Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte in verschiedenen Phasen des Wachstums.

4. Exkretion verschiedener Metabolite des Cystein-Stoffwechsels

4.1. Nachweis von O-Acetylserin und N-Acetylserin im Medium

Der aufgrund voriger Ergebnisse postulierte intrazelluläre NAS-Mangel bei YdeD-Überproduktion könnte zwei mögliche Ursachen haben: Die erste ist, daß der NAS-Spiegel wegen einer hohen intrazellulären Cystein-Konzentration, durch die die O-Acetylserin (OAS)-Bildung gehemmt würde, sehr niedrig ist. Diese Möglichkeit ist aber unwahrscheinlich, da eine Supplementation mit Cystin den Wachstumsdefekt auf Sulfat wieder beheben kann (s. Abb. 9). Die zweite - wahrscheinlichere - Erklärung ist, daß die Überproduktion des Membranproteins YdeD neben der Cystein-Exkretion zusätzlich noch zur Ausscheidung von O- und/oder N-Acetylserin führt.

Um diese These zu prüfen wurde das Kulturmedium nach Wachstum von Yde-überproduzierenden Zellen in SM1-Medium mit Hilfe eines Aminosäure-Analysators auf seinen Aminosäure-Gehalt untersucht.

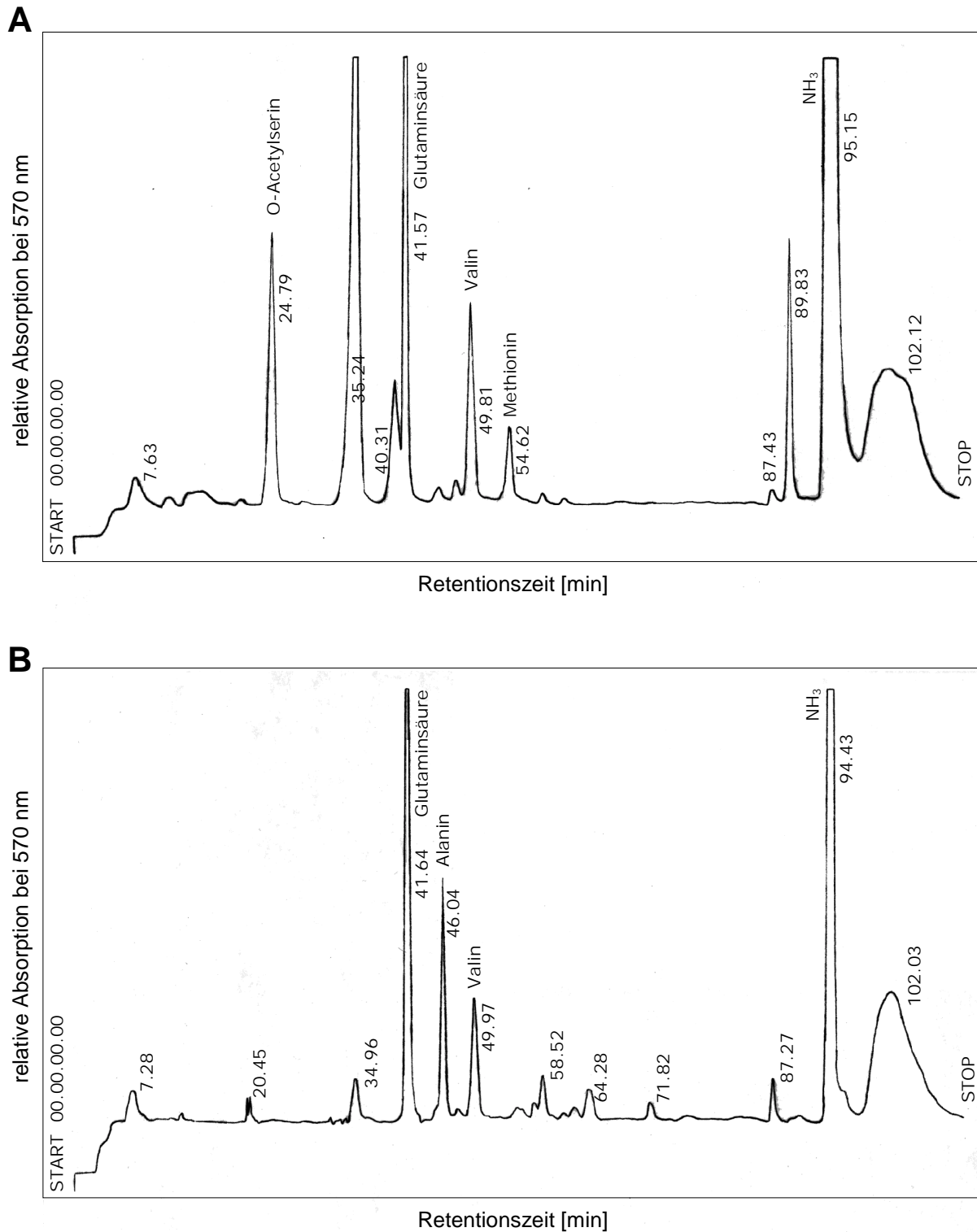


Abbildung 12: Analyse von Kulturüberständen von W3110 pKP291 (A) und W3110 pACYC184-LH (B) mit einem Aminosäure-Analysator. Je 20 ml SM1-Minimalmedium inklusive Thiosulfat (1,6 mM) und Methionin (0,66 mM) wurden mit in LB-Medium angezogenen Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,02 (W3110 pKP291) bzw. 0,002 (W3110 pACYC184-LH) angeimpft und anschließend bei 30 °C inkubiert. Die Überstände von frühstationären Kulturen (22-26 h nach Beimpfen) wurden 1:4 mit Auftragspuffer verdünnt und dann auf die Säule des Aminosäure-Analysators aufgetragen. Das supplementierte Methionin war in der Kultur von W3110 pKP291 zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht vollständig verbraucht.

Das Elutionsprofil zeigt eine Substanz, die exakt an der Position von authentischem OAS eluiert (Abb. 12A). Um zu bestätigen, daß es sich dabei tatsächlich um diese Verbindung handelte, wurde der Kulturüberstand zunächst einer Behandlung unter alkalischen Bedingungen unterzogen (30 min pH 8,5) und erneut analysiert. Nach dieser Behandlung war die auf Höhe von OAS eluierende Verbindung vollständig verschwunden (Daten nicht gezeigt). Dies kann dadurch erklärt werden, daß sich OAS bei diesem pH-Wert sehr schnell zu NAS umlagert (Kredich und Tomkins, 1966) und NAS nicht mit mehr Ninhydrin reagieren kann. Wurde der Kulturüberstand dagegen einer sauren Hydrolyse unterzogen (4 n HCl bei 100 °C für 2 h), eine Bedingung, bei der die Acetylgruppe sowohl von OAS als auch von NAS abgespalten wird, war nun ein deutliches Signal auf Höhe von authentischem Serin zu beobachten. Die daraus abgeleitete Serin-Konzentration war etwa doppelt so hoch wie zu erwarten, wenn nur OAS in der Probe vorhanden gewesen wäre. Das bedeutet, daß neben OAS auch NAS im unbehandelten Kulturüberstand vorhanden gewesen sein muß. Für beide Verbindungen wurde eine Konzentration im Medium von etwa 1 mM errechnet.

Durch diesen eindeutigen Nachweis von OAS und NAS im Medium von YdeD-überproduzierenden Zellen wurde die Hypothese, daß die unzureichende Induktion des Cystein-Regulons durch die übermäßige Exkretion von OAS und/oder NAS verursacht wird, untermauert.

Außer OAS waren noch weitere ninhydrin-reaktive Verbindungen im Kulturüberstand von W3110 pKP291 vorhanden (Abb. 12A), die im Medium von Kontrollzellen nicht nachweisbar waren (Abb. 12B). Dabei handelt es sich offenbar um Substanzen, die ebenfalls spezifisch bei Überproduktion von YdeD ausgeschieden werden. Auf die Art und Menge dieser Verbindungen wird in Abschnitt 6 näher eingegangen. Die Exkretion von Glutaminsäure, Valin und Alanin erfolgte unabhängig von der YdeD-Überproduktion (Abb. 12 und Abb. 23, Abschnitt 6.2.).

4.2. Nachweis der 2-Methyl-2,4-Thiazolidindicarbonsäure im Medium

Obwohl Cystein im Kulturüberstand von W3110 pKP291 eindeutig mit dem sauren Ninhydrin-Reagenz nachgewiesen werden konnte, war mit Hilfe des Aminosäure-Analysators weder freies Cystein noch Cystin zu detektieren. Das könnte daran liegen, daß sowohl Cystein als auch Cystin in der Lage sind, jeweils spontan mit dem Thiosulfat des Mediums zu Cysteinsulfonsäure bzw. Cysteinthiosulfonsäure zu reagieren (Szczepkowski, 1958). Beide Cysteinderivate würden aufgrund ihrer negativen Nettoladung nicht mehr an die Kationenaustauscher-Matrix binden und mit dem Durchlauf eluieren.

Um nun genaueren Aufschluß über die Form, in der das Cystein im Kulturüberstand vorlag, zu bekommen, wurde eine Fermenteranzucht von W3110 pKP291 durchgeführt, da aufgrund

der höheren Zelldichte im Fermenter größere Produktausbeuten erzielt werden konnten, was die Analytik erleichterte.

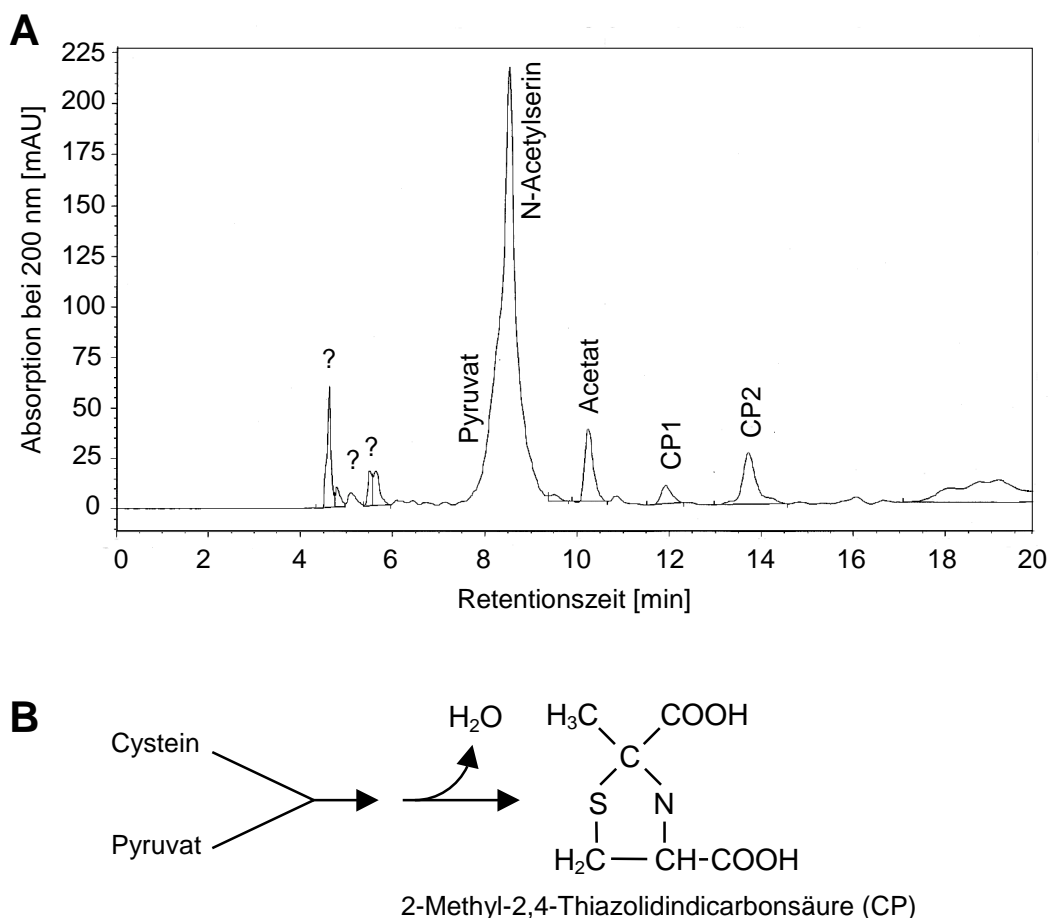


Abbildung 13: A. Analyse des Kulturüberstandes von W3110 pKP291 mittels HPLC. Die Anzucht im Fermenter erfolgte in SM1-Medium, das mit LB-Medium (10%), Thiosulfat (8 mM) und Thiamin (0,5 mg/l) supplementiert worden war (Daßler *et al.*, 2000). Die Abbildung zeigt das Elutionsprofil des Kulturüberstandes (1 µl) nach 24 h Fermentation nach Auftrennung über eine HPLC-Säule (Luna 5 µ C 18(2)) mit anschließender Detektion bei 200 nm. Die bei 4-6 min eluierenden Substanzen konnten nicht identifiziert werden.

B. Schematische Darstellung der Thiazolidin-Bildung aus Cystein und Pyruvat. Zunächst entsteht als Zwischenprodukt ein Hemithioketal, das dann nach Wasserabspaltung in die 2-Methyl-2,4-Thiazolidindicarbonsäure übergeht (Schubert, 1937).

Das Elutionsprofil der HPLC-Analyse zeigt zwei bei 12 bzw. 14 min eluierende Verbindungen (CP1 bzw. CP2), die nach Cochromatographie mit authentischen Reinsubstanzen als die beiden Isomere der 2-Methyl-2,4-Thiazolidindicarbonsäure (Thiazolidin) identifiziert werden konnten (Abb. 13A). Thiazolidin ist das relativ stabile Kondensationsprodukt einer spontanen Reaktion von Cystein mit Pyruvat (Schubert, 1937; Abb. 13B). Eine Quantifizierung der beiden Thiazolidin-Isomere ergab in Summe 1,15 g/l, was einem Cystein-Wert von 0,73 g/l entspricht. Dieser Wert stimmt gut mit dem im Ninhydrin-Test bestimmten Cystein-Wert von

0,7 g/l überein, was zeigt, daß das Cystein vollständig im Thiazolidin gebunden vorlag. Dieser Befund liefert die Erklärung, warum bei der spezifischen Analyse auf freie Amino-
gruppen im Aminosäure-Analysator weder Cystein noch Cystin nachweisbar waren, da im Thiazolidin die freie Aminogruppe des Cysteins blockiert ist. Unter den verhältnismäßig harschen Bedingungen des spezifischen Cystein-Bestimmungstests (Kochen bei stark saurem pH-Wert in Gegenwart von Ninhydrin) wurde das Cystein jedoch aus dem Thiazolidin wieder freigesetzt und konnte somit nachgewiesen werden.

Die Frage, wo die Thiazolidin-Bildung erfolgte, ob bereits in der Zelle, oder erst extrazellulär, was theoretisch aufgrund des dort vorhandenen Pyruvats (Abb. 13A) auch denkbar wäre, konnte nicht geklärt werden. Deshalb wird im weiteren Verlauf bei der Verwendung des Begriffs "Cystein-Exkretion" auch immer die Möglichkeit einer Thiazolidin-Exkretion miteingeschlossen.

Neben dem Thiazolidin und den organischen Säuren Acetat und Pyruvat war außerdem noch NAS (ca. 5 mM) nachweisbar, aber im Gegensatz zu den Anzuchten im Schüttelkolben kein OAS (Abb. 13A). Der Grund hierfür ist, daß während der Fermentation der pH-Wert konstant bei etwa 7 gehalten wurde, während er in der Schüttelkolbenanzucht auf Werte von 4,5-5 absank. Unter letzteren Bedingungen ist OAS wesentlich stabiler gegen die irreversible Umlagerung zu NAS. Es ist aber unwahrscheinlich, daß es sich bei NAS um ein direktes Exkretionsprodukt handelt. Vielmehr ist anzunehmen, daß NAS erst sekundär im Medium durch Umlagerung aus dem ausgeschiedenen OAS entstanden ist. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, daß unter geeigneten Fermentationsbedingungen (pH 6) das ausgeschiedene OAS stabilisiert wird und so die Bildung von NAS deutlich reduziert werden kann (T. Maier, persönliche Mitteilung).

4.3. Zusammenhang zwischen der Exkretion von O-Acetylserin und Cystein

4.3.1. Zeitlicher Verlauf der O-Acetylserin- und Cystein-Exkretion

Im Kulturüberstand von YdeD-überproduzierenden Zellen sind unter geeigneten Anzuchtbedingungen gleichzeitig OAS und Cystein nachweisbar. Nachdem beide Verbindungen im Stoffwechsel eng miteinander verknüpft sind (OAS ist in der Cystein-Biosynthese die direkte Vorstufe von Cystein), ergab sich die Frage, ob möglicherweise auch die Exkretion beider Verbindungen in einem kausalen Zusammenhang steht.

Um dies zu klären, wurde der zeitliche Verlauf der OAS- und der Cystein-Exkretion detailliert aufgelöst. Dazu wurde der Stamm W3110 pKP291 in SM1-Medium in Schüttelkölben kultiviert und es wurden regelmäßig Proben für die Bestimmung von OAS und Cystein im

Kulturüberstand entnommen. Wie Abbildung 14 zeigt, erfolgte schon während des exponentiellen Wachstums eine massive Exkretion von OAS, wobei Maximalwerte von ca. 1 mM erreicht wurden. Genau ab dem Zeitpunkt des Übergangs in die stationäre Phase begann allerdings die OAS-Menge im Medium wieder zu sinken. Gleichzeitig mit der Abnahme von OAS war aber eine Zunahme von Cystein im Medium zu beobachten. Cystein, das in der logarithmischen Phase zuvor nicht nachweisbar gewesen war, erreichte schließlich eine Maximalkonzentration von etwa 0,4 mM.

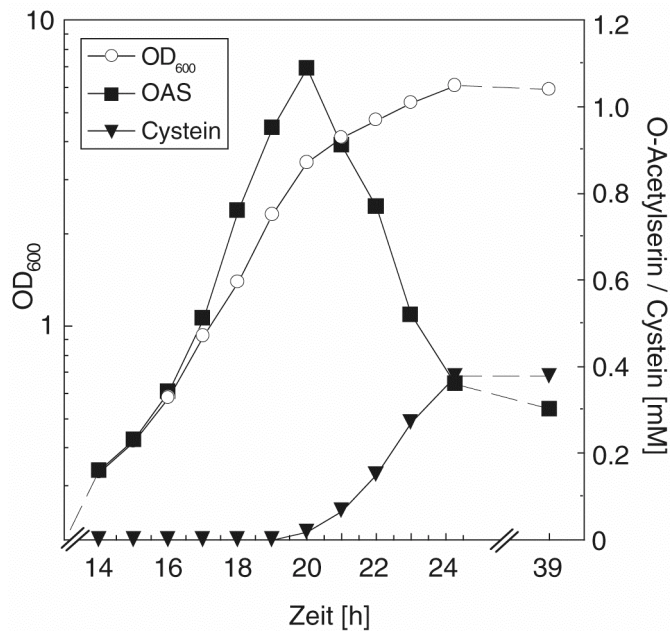


Abbildung 14: Bestimmung von O-Acetylserin und Cystein im Medium. Die Anzucht der Zellen des Stammes W3110 pKP291 erfolgte in SM1-Medium plus Thiosulfat und Methionin (vgl. Abb. 12). OAS wurde mittels des Aminosäure-Analysators, Cystein mit dem sauren Ninhydrin-reagenz bestimmt.

4.3.2. Zusammenhang zwischen der Wiederaufnahme von O-Acetylserin oder N-Acetylserin mit der Cystein-Exkretion

Auf die Frage, warum die OAS-Menge im Medium wieder abnimmt, gibt es zwei mögliche Antworten: Erstens, OAS lagert sich rasch zu NAS um und ist somit dem Nachweis mit Ninhydrin nicht mehr zugänglich, oder zweitens, OAS wird von den Zellen wieder aufgenommen.

Die Ursache für die Abnahme von OAS wurde wie folgt untersucht: Die Zellen wurden etwa zum Zeitpunkt der maximalen OAS-Konzentration im Medium (Übergang in die stationäre Phase) durch Zentrifugation entfernt und der nahezu zellfreie Kulturüberstand wurde anschließend weiterinkubiert und auf OAS hin analysiert. Dabei ergab sich eine OAS-Abnahmerate von ca. 2-3% / h bei einem konstant bleibenden pH-Wert von 6-6,5. Die OAS-Abnahmerate im Medium in Anwesenheit von Zellen betrug dagegen zwischen 12-17 % / h, obwohl mit zunehmender Inkubationsdauer der pH-Wert bis auf 5 absank, wodurch OAS gegen die Umlagerung zu NAS noch weiter stabilisiert wurde. Damit war geklärt, daß die

OAS-Abnahme im Medium in erster Linie eine Folge der Wiederaufnahme in die Zellen war und nur zu einem geringen Anteil auf der Umlagerung zu NAS beruhte.

Da die Cystein-Exkretion erst ab dem Zeitpunkt der OAS-Wiederaufnahme erfolgte, lag die Vermutung nahe, daß beide Prozesse offenbar physiologisch eng miteinander verknüpft sind, etwa derart, daß das wiederaufgenommene OAS in der Zelle sofort mit dem vorhandenen Thiosulfat zu Cystein umgesetzt und dieses danach ausgeschieden wird. Somit wäre die primäre Ausschleusung und anschließende Wiederaufnahme von OAS überhaupt erst die Voraussetzung dafür, daß diese Zellen Cystein ausscheiden.

Diese These konnte durch weitere Experimente untermauert werden. Wurde einer Kultur von W3110 pKP291 beispielsweise in der logarithmischen Wachstumsphase oder zu Beginn der frühstationären Phase noch zusätzlich externes OAS angeboten, erfolgte eine deutlich stärkere Cystein-Exkretion als ohne diesen Zusatz (Abb. 15), was zeigt, daß das wiederaufgenommene OAS zu Cystein umgesetzt werden kann.

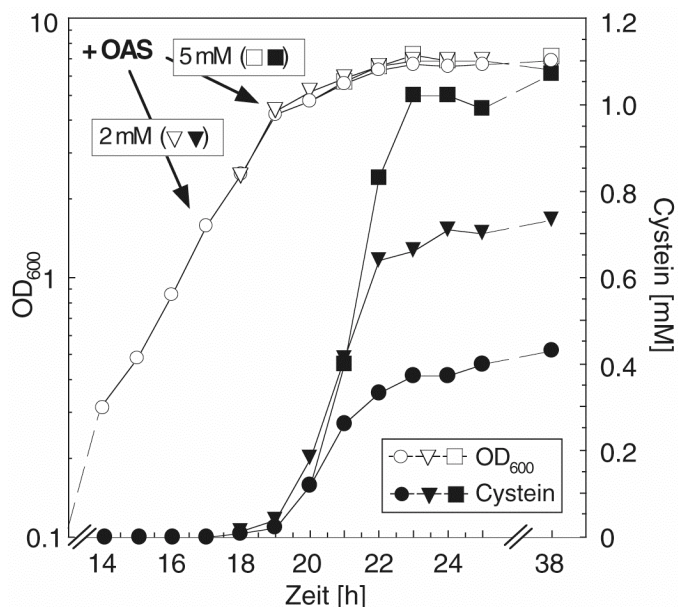


Abbildung 15: Steigerung der Cystein-Exkretion durch Supplementation mit O-Acetylserin. Die Anzucht von W3110 pKP291 erfolgte wie in Abbildung 12 beschrieben. Zu den markierten Zeitpunkten wurde je ein Aliquot der Kultur entnommen und mit externem OAS supplementiert.

Durch ein vermehrtes externes OAS-Angebot konnte aber nicht nur die Cystein-Ausbeute, sondern auch die maximale Cystein-Exkretionsrate gesteigert werden (Tab. 8). Das bedeutet, daß unter diesen Bedingungen die Verfügbarkeit von OAS der limitierende Faktor bei der Cystein-Synthese und -Exkretion war.

Tabelle 8: Cystein-Exkretionsrate von W3110 pKP291 nach Supplementierung der Kultur mit unterschiedlichen O-Acetylserin-Mengen

externer OAS-Zusatz [mM]	-	2 ^a	5 ^a
maximale Cystein-Exkretionsrate [mM/h]	0,12	0,23	0,35

a. Zum Zeitpunkt der OAS-Supplementation war im Medium bereits von den Zellen ausgeschiedenes OAS (ca. 0,7 mM) vorhanden.

Betrachtet man den Verlauf der OAS-Aufnahme (s. Abb. 14), fallen zwei Dinge auf: a) es wird mehr OAS verbraucht als Cystein ausgeschieden wird und b) OAS wird nicht vollständig reabsorbiert, was umso deutlicher wird, wenn OAS (5 mM) noch zusätzlich supplementiert wurde (ca. 4 mM Rest-OAS im Medium nach 38 h).

Der im Vergleich zur Cystein-Bildung größere OAS-Verbrauch ist dadurch zu erklären, daß sich OAS extrazellulär wie intrazellulär allmählich zu NAS umlagert und somit für die Cystein-Biosynthese als Vorläufer-Molekül nicht mehr zur Verfügung steht. Desweiteren erfolgte auch noch nach Beginn der OAS-Wiederaufnahme eine Zunahme an Zellmasse, wofür das gebildete Cystein benötigt wurde.

Warum OAS nicht vollständig zu Cystein umgesetzt wurde, ist unklar, wobei ein Mangel an reduziertem Schwefel als Ursache ausgeschlossen werden konnte: Eine Kultur, der in der frühstationären Phase neben OAS auch noch weiteres Thiosulfat (0,4 g/l) zugesetzt wurde, produzierte nicht mehr Cystein als ohne diese zusätzliche Schwefel-Supplementation.

Ein Zusatz von DL-NAS (6 mM) brachte hingegen nur eine minimale Steigerung der Cystein-Ausbeute (Daten nicht gezeigt), was vermutlich mehrere Gründe hat: a) NAS wird deutlich schlechter in die Zellen aufgenommen als OAS (Ostrowski und Kredich, 1989), und b) die Umwandlung von NAS in OAS ist nur unter extrem sauren Bedingungen möglich (Narita, 1959), was bedeutet, daß NAS nicht als Vorstufe für die Cystein-Biosynthese dienen kann. Die geringe, aber signifikante Steigerung der Cystein-Ausbeute nach NAS-Zugabe ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß durch NAS das Cystein-Regulon stärker induziert wird, was eine erhöhte O-Acetylserin-Sulfhydrylase-Aktivität und damit einen schnelleren Schwefel-Einbau zur Folge hat.

4.3.3. Cystein-Exkretion nach O-Acetylserin-Supplementation ohne YdeD-Überproduktion

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, wie sich ein Wildtypstamm ohne YdeD-Überproduktion nach Zugabe von OAS verhält. Diese Zellen enthalten zwar eine chromo-

somale Kopie des *ydeD*-Gens, scheiden aber normalerweise weder OAS noch Cystein aus (s. Abbn. 8B und 12B).

Auch hier hatte die externe OAS-Zugabe eine deutlich meßbare Cystein-Exkretion zur Folge (Abb. 16). Dabei fällt aber auf, daß trotz des vergleichbaren OAS-Angebots deutlich weniger Cystein gebildet wurde (ca. 0,4 mM Cystein bei 5 mM OAS) als bei den *YdeD*-überproduzierenden Zellen (ca. 1 mM bei 5 mM OAS). Das Ausmaß der Cystein-Exkretion war aber - ähnlich wie bei W3110 pKP291 - von der angebotenen OAS-Menge abhängig. Im Unterschied zu den *YdeD*-überproduzierenden Zellen war aber zu beobachten, daß das Wachstum von W3110 pACYC184-LH durch OAS dosisabhängig beeinträchtigt wurde.

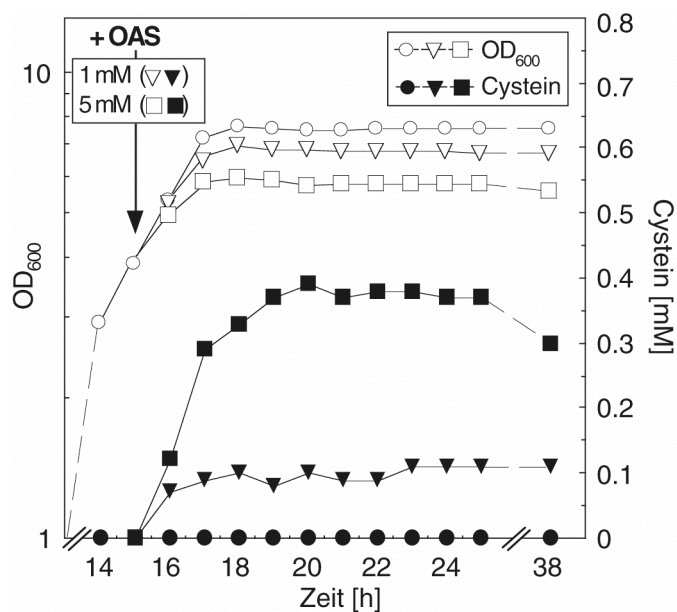


Abbildung 16: Cystein-Exkretion ohne *YdeD*-Überproduktion. Die Anzucht von W3110 pACYC184-LH erfolgte wie in der Legende zu Abbildung 12 beschrieben in SM1-Medium plus Thiosulfat und Methionin. Zum markierten Zeitpunkt wurde die Kultur gedrittelt und zwei Aliquots mit den jeweils angezeigten Mengen OAS supplementiert.

Das Ergebnis, daß Zellen ohne *YdeD*-Überproduktion nach OAS-Supplementation ebenfalls Cystein ausscheiden, zeigt deutlich, daß der wesentliche Beitrag von *YdeD* zur Cystein-Produktion in der primären Ausschleusung und der anschließenden Wiederaufnahme von OAS liegt.

5. *In vivo*-Transportstudien mit potentiellen Substraten von *YdeD*

Bei Überproduktion des *YdeD*-Proteins von *E. coli*-Wildtypzellen findet man im Medium verschiedene Metabolite des Cystein-Stoffwechsels (Cystein, gebunden im Thiazolidin; OAS; NAS) und einige weitere Aminosäuren, die im Kulturüberstand von Kontrollzellen nicht nachweisbar sind (s. Abb. 12). Der Befund, daß es sich bei *YdeD* um ein integrales Membranprotein handelt, legte die Vermutung nahe, daß die Exkretion der verschiedenen Verbindungen die Folge einer Export-Aktivität von *YdeD* sein könnten. Diese potentielle Aktivität wurde durch *in vivo*-Transportstudien mit verschiedenen radioaktiv-markierten

Aminosäuren an ruhenden Zellen näher getestet, da mit diesem sensitiven System der Flux der Verbindungen sehr genau verfolgt werden kann.

Die einfachste Möglichkeit zu untersuchen, ob YdeD an bestimmten Transportprozessen beteiligt ist, bestand darin, die Aufnahme rate verschiedener Substanzen von YdeD-überproduzierenden Zellen mit der entsprechenden Aufnahme rate von Kontrollzellen zu vergleichen. Dabei waren mehrere Szenarien vorstellbar: Erstens, es besteht kein Unterschied in der Aufnahme rate, was bedeuten würde, daß YdeD offensichtlich nicht an dem Transport der entsprechenden Substanz beteiligt ist (Abb. 17A). Zweitens, die Aufnahme rate ist nach YdeD-Überproduktion größer als bei den Kontrollzellen, was bedeutet, daß YdeD wahrscheinlich ein Aufnahmesystem für diese Verbindung darstellt (Abb. 17B). Die dritte Möglichkeit besteht darin, daß die YdeD-Überproduktion zu einer verminderten Nettoaufnahme rate führt, was ein gutes Indiz dafür wäre, daß die entsprechende Verbindung sofort nach Aufnahme in die Zelle durch eine Export-Aktivität von YdeD wieder ausgeschleust wird (Abb. 17C).

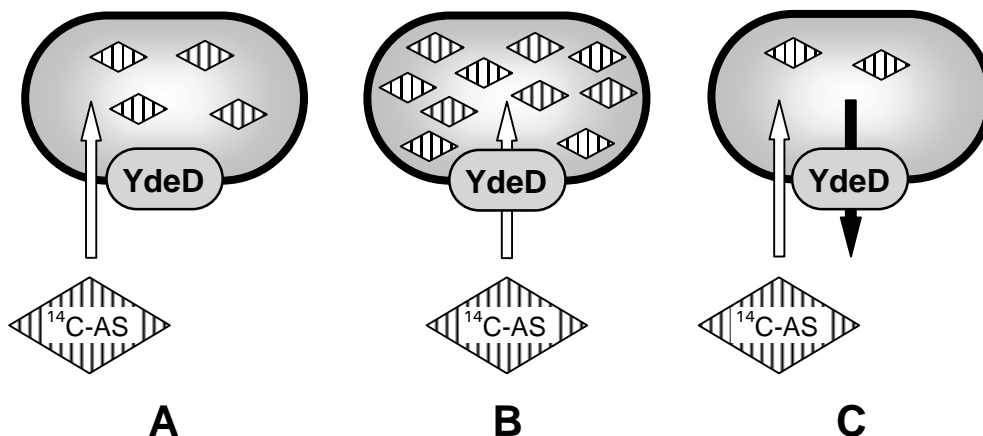


Abbildung 17: Modelle für eine mögliche Beteiligung von YdeD an Transportprozessen. A. YdeD ist weder an der Aufnahme noch am Efflux der Verbindung beteiligt. B. YdeD stellt ein Aufnahmesystem für die entsprechende Verbindung dar. C. YdeD vermittelt den Efflux der Verbindung. ^{14}C -AS steht dabei für eine beliebige ^{14}C -markierte Aminosäure.

5.1. Aufnahme von ^{14}C -Cystin

Zunächst wurde der Transport von ^{14}C -Cystin untersucht. Dazu wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und zweimal mit einem Puffer, der Chloramphenicol enthielt, gewaschen. Chloramphenicol diente dazu, die Proteinbiosynthese der Zelle zu blockieren, damit bei den *in vivo*-Transportversuchen die radioaktiv-markierten Aminosäuren nicht in Proteine inkorporiert werden, sondern als freie Moleküle in der Zelle vorliegen. Dies

wiederum ist eine wesentliche Voraussetzung dafür, daß es auch wieder zu einem Export dieser Verbindungen kommen kann (vgl. Abb. 17C).

Die gewaschenen Zellen wurden dann in entsprechender Verdünnung direkt in den Transportversuch eingesetzt (s. Material und Methoden, Abschnitt 5.3.).

Das Ergebnis des Cystin-Aufnahmeexperiments stellte sich wie folgt dar: Die Zellen zeigten nach YdeD-Überproduktion eine deutlich langsamere Initialrate bei der Nettoaufnahme von Cystin als die Kontrollzellen (Abb. 18A), was sich gut mit dem in Modell C (Abb. 17) dargestellten Szenario beschreiben läßt. Demnach würde Cystin zwar zunächst von den YdeD-überproduzierenden Zellen mit derselben Rate wie von den Kontrollzellen aufgenommen, aber sofort durch die Export-Aktivität von YdeD wieder ausgeschieden werden. Dabei ist es allerdings wahrscheinlich, daß das Cystin in der Zelle aufgrund des hohen Reduktionspotentials zuerst mit Hilfe von Thioredoxin oder Glutathion zu Cystein reduziert (Funane *et al.*, 1987) und in dieser Form wieder ausgeschleust wird.

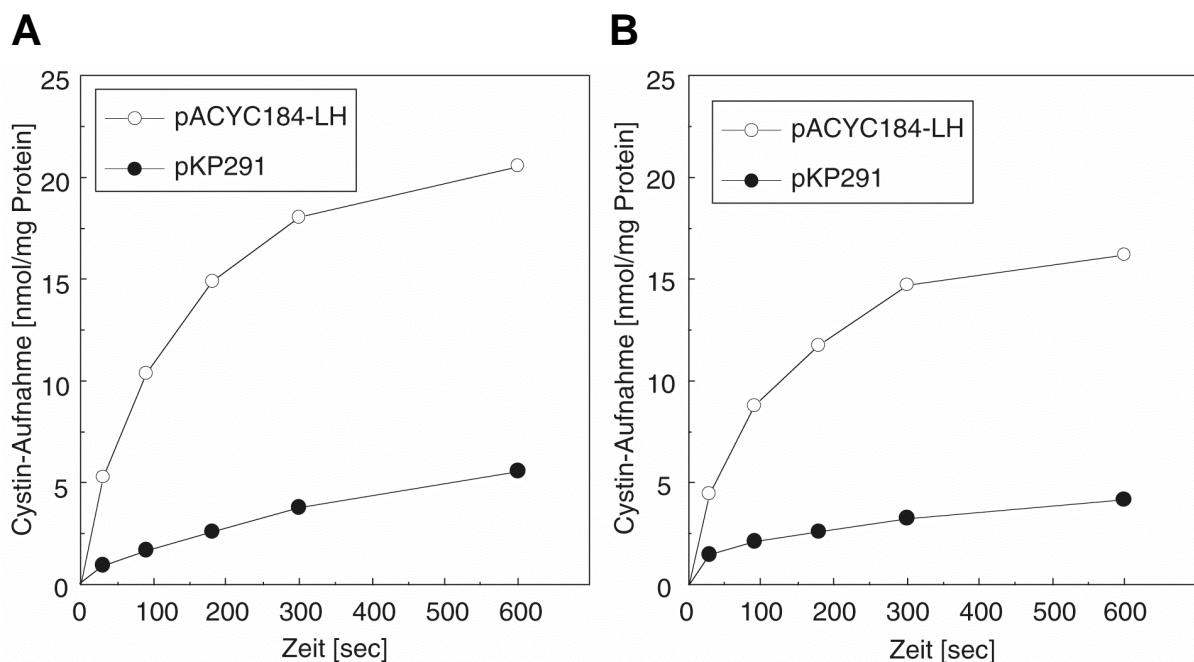


Abbildung 18: *In vivo*-Transport von $[^{14}\text{C}]$ -Cystin. Die Anzucht der Stämme MC4100 (A) und BTM149 (B), jeweils mit den Plasmiden pKP291 bzw. pACYC184-LH, erfolgte in SM1-Medium mit Thiosulfat (1,6 mM) und 10% LB-Anteil. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von $0,2 \mu\text{Ci } [^{14}\text{C}]$ -Cystin ad $50 \mu\text{M}$ (spezifische Aktivität: $13,3 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) gestartet. Von einer Probe einer noch unmarkierten Zellsuspension wurde jeweils der Proteingehalt bestimmt.

Eine weitere Erklärung für die drastisch verminderte Cystin-Aufnahmerate der YdeD-überproduzierenden Zellen könnte jedoch sein, daß entweder speziell das Cystin-Aufnahmesystem oder Membrantransportprozesse allgemein bei YdeD-Überproduktion

beeinträchtigt sind. Wie im folgenden dargestellt, konnte aber gezeigt werden, daß beide Möglichkeiten unwahrscheinlich sind.

Bekanntermaßen besitzt *E. coli* zwei Aufnahmesysteme für Cystin (Leive und Davis, 1965). Dabei besitzt das spezifische System eine hohe Affinität für Cystin ($K_m = 2 \times 10^{-8}$ M), während das allgemeine System, das neben Cystin auch noch α,ϵ -Diaminopimelinsäure transportiert, einen deutlich niedrigeren K_m -Wert von 3×10^{-7} M aufweist (Berger und Heppel, 1972). Die Substratbindung erfolgt in beiden Systemen über periplasmatische Bindeproteine. Obwohl die Regulation der Expression dieser Systeme noch nicht im Detail bekannt ist, gibt es Hinweise dafür, daß zumindest das allgemeine Cystin-Aufnahmesystem Teil des Cystein-Regulons ist und daß somit seine Synthese in Abhängigkeit von der S-Quelle reguliert wird. Wie aus vorhergehenden Versuchen bekannt, war unter den speziellen Anzuchtbedingungen für das Cystin-Aufnahmeexperiment (SM1-Medium mit Thiosulfat und 10% LB-Medium) zum Zeitpunkt der Ernte das Cystein-Regulon der YdeD-überproduzierenden Zellen nur etwa halb so stark induziert, wie bei den Kontrollzellen (vgl. Tab. 7). Als Folge davon war vermutlich ein Cystin-Aufnahmesystem nicht in dem Umfang vorhanden wie bei den Kontrollzellen. Daß die verminderte Cystin-Nettoaufnahme bei YdeD-überproduzierenden Zellen aber dennoch nicht die Folge des Mangels an einem Aufnahmesystem war, konnte dadurch untermauert werden, daß sich für CysB^c-Zellen, bei denen auch trotz YdeD-Überproduktion das Cystein-Regulon vergleichbar stark induziert ist, ein ähnliches Bild ergab, wie für den CysB-Wildtypstamm MC4100 (Abb. 18B).

Um zu untersuchen, ob möglicherweise eine allgemeine Beeinträchtigung von Membrantransportprozessen durch YdeD die Ursache für die langsamere Cystin-Aufnahme war, wurde exemplarisch die Aufnahme von Phenylalanin getestet. Phenylalanin ist eine von Cystin strukturell deutlich verschiedene Aminosäure und wurde zudem nie im Kulturüberstand von YdeD-überproduzierenden Zellen nachgewiesen, was bedeutet, daß Phenylalanin offenbar kein Substrat für YdeD darstellt.

Für Phenylalanin gibt es ebenfalls mehrere Transportsysteme. Dabei codiert das *aroP*-Gen für das allgemeine Aufnahmesystem für aromatische Aminosäuren (Brown, 1970) und das *pheP*-Gen für das phenylalanin-spezifische System (Pi *et al.*, 1991). Der Transport von Phenylalanin wird in beiden Systemen von der protonenmotorischen Kraft angetrieben (Pittard, 1996). Die Beteiligung des *azaB*-Genprodukts am Transport von aromatischen Aminosäuren ist noch unklar (Williams *et al.*, 1980).

Das Resultat des Transportversuchs mit Phenylalanin läßt sich gut mit Hilfe des in Abbildung 17 dargestellten Modells A interpretieren, was bedeutet, daß YdeD an diesem Transportprozeß offenbar nicht beteiligt ist und ihn auch nicht signifikant negativ beeinflusst (Abb. 19).

Daraus ist abzuleiten, daß bei YdeD-Überproduktion wahrscheinlich auch andere Transportvorgänge nicht nennenswert beeinträchtigt sind.

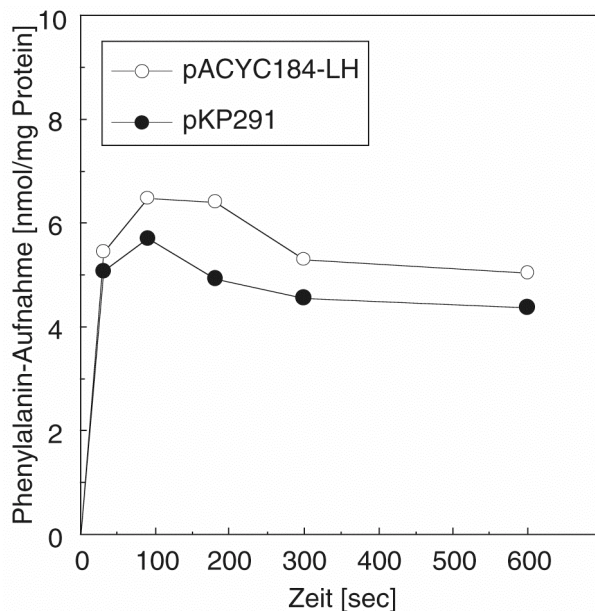


Abbildung 19: *In vivo*-Transport von [¹⁴C]-Phenylalanin. Die Anzucht des Stammes MC4100 pKP291 bzw. pACYC184-LH erfolgte wie in der Legende zu Abbildung 18 beschrieben. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von 0,2 µCi [¹⁴C]-Phenylalanin ad 100 µM (spezifische Aktivität: 6,6 µCi/µmol) gestartet.

5.2. Aufnahme von [¹⁴C]-O-Acetylserin

Nachdem Zellen bei YdeD-Überproduktion auch OAS ausscheiden, sollte die Beteiligung von YdeD am OAS-Transport ähnlich wie für Cystin mit Hilfe von *in vivo*-Aufnahmeexperimenten untersucht werden.

Da radioaktiv-markiertes OAS nicht kommerziell erhältlich ist, wurde [¹⁴C]-OAS zunächst aus [¹⁴C]-Serin und Eisessig hergestellt. Die Umsetzung wurde mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Autoradiographie überprüft. Die densitometrische Quantifizierung ergab eine Ausbeute von ca. 95 % [¹⁴C]-OAS mit begleitenden Verunreinigungen in Form von nicht-umgesetzten [¹⁴C]-Serin und gebildetem [¹⁴C]-NAS von je 2-3 %.

Über die OAS-Aufnahme von *E. coli* ist bisher nichts bekannt. Da OAS aber eine bedeutende Rolle in der Cystein-Biosynthese spielt, wäre es durchaus denkbar, daß ein potentielles OAS-Aufnahmesystem ein Teil des Cystein-Regulons ist. Um aber schon a priori auszuschließen, daß die OAS-Aufnahme durch unterschiedlich starke Induktion des Cystein-Regulons beeinflusst wird, erfolgte die Anzucht in SM1-Medium mit Cystin als zusätzlicher S-Quelle. Unter diesen Bedingungen ist das Cystein-Regulon in YdeD-überproduzierenden Zellen etwa vergleichbar stark induziert wie in den Kontrollzellen (s. Tab. 7).

Die initiale OAS-Aufnahmerate war bei YdeD-Überproduktion deutlich niedriger als bei den Kontrollzellen (Abb. 20), was ähnlich wie bei dem Transportexperiment mit Cystin dadurch

erklärt werden könnte, daß das aufgenommene OAS durch die Aktivität des YdeD-Proteins sofort wieder aus der Zelle ausgeschleust wird, was eine langsamere OAS-Nettoaufnahme zur Folge hätte (vgl. Modell C in Abb. 17).

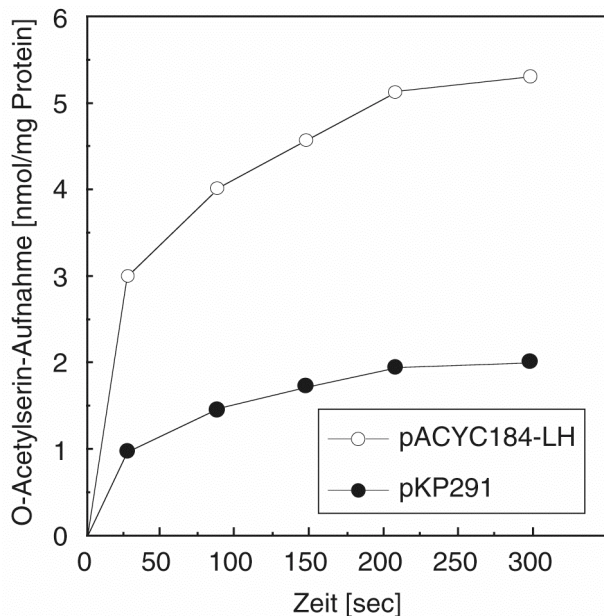


Abbildung 20: *In vivo*-Transport von [¹⁴C]-O-Acetylserin. Die Anzucht des Stammes W3110 pKP291 bzw. pACYC184-LH erfolgte in SM1-Medium mit Cystin (0,5 mM) als zusätzlicher S-Quelle. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von 0,2 μ Ci [¹⁴C]-O-Acetylserin ad 100 μ M (spezifische Aktivität: 6,6 μ Ci/ μ mol) gestartet.

6. Analyse weiterer Exkretionsprodukte bei YdeD-Überproduktion

Bei der Analyse des Mediums auf den Gehalt verschiedener Aminosäuren nach Wachstum von YdeD-überproduzierenden Zellen wurden neben OAS noch weitere ninhydrin-reaktive Verbindungen detektiert. Neben den Aminosäuren Glutaminsäure und Valin, die bei den Kontrollzellen ebenfalls nachgewiesen werden konnten, waren aber vor allem die bei 35.24 min, 40.31 min und 89.83 min eluierenden Substanzen von Interesse, da sie offensichtlich nur bei YdeD-Überproduktion ausgeschieden wurden (s. Abb. 12).

Eine Analyse durch Cochromatographie mit authentischen Referenzverbindungen erbrachte, daß sich das Signal bei 35.24 min aus möglicherweise Asparagin und Glutamin zusammensetzte, da das Elutionsverhalten dieser Substanzen auf der Säule des Aminosäure-Analysators nicht zu unterscheiden war. Deshalb wurde zur genauen Differenzierung eine andere Analysemethoden angewendet: Nach der Derivatisierung der aminogruppen-haltigen Verbindungen des Kulturüberstandes mit o-Phthalaldehyd (OPA) erfolgte eine chromatographische Auftrennung über eine Reverse-Phase/HPLC-Säule (C. Gaebert, Consortium). Mittels dieser Analyse konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß sowohl Asparagin als auch Glutamin in der Probe enthalten waren (Abb. 21).

Außerdem konnte noch Homoserin als eine spezifisch von YdeD-überproduzierenden Zellen ausgeschiedene Verbindung identifiziert werden (Abb. 21; Verbindung bei 40,31 min bei Analyse mit dem Aminosäure-Analysator in Abb. 12A).

Die bei 89,83 min eluierende Substanz (vgl. Abb. 12A) konnte trotz Verwendung aller 20 proteinogenen Aminosäuren, verschiedener Aminosäurederivate und Aminozucker als Referenzen nicht eindeutig bestimmt werden. Entsprechend dem Retentionsverhalten könnte es sich um eine positiv geladene Aminosäure handeln, da sie zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie Lysin und Arginin eluiert.

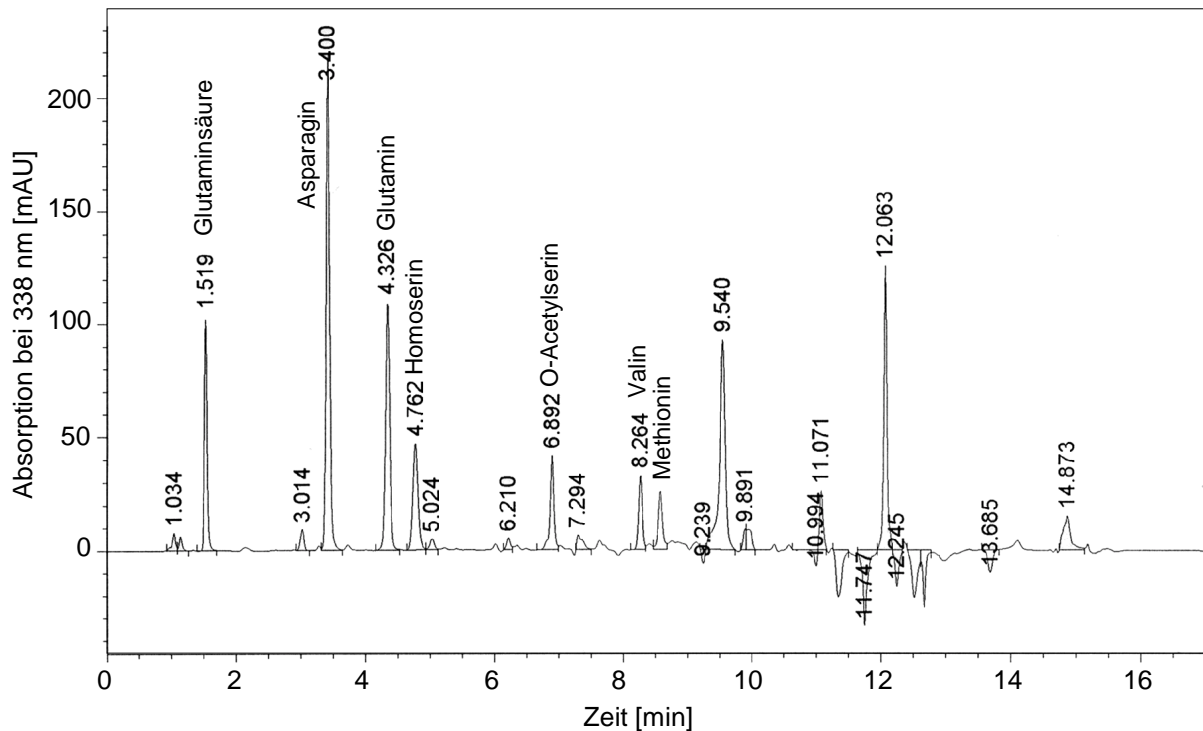


Abbildung 21: Reverse-Phase/HPLC-Trennung von OPA-derivatisierten Aminosäuren. Nach 24 h Wachstum von W3110 pKP291 (Anzucht wie in Legende zu Abbildung 12 beschrieben) wurde der Kulturüberstand (100 μ l) mit OPA-Reagenz (1 μ l) versetzt und 1 μ l wurde davon automatisch auf die Säule aufgespritzt. Die Detektion der fluoreszierenden Verbindungen erfolgte bei 338 nm. Bei den Verbindungen bei 9.540 min und 12.063 min handelt es sich um verschiedene OPA-Derivate von NH_3 .

6.1. Verlauf der Exkretion von Asparagin und Glutamin

Die Exkretion von Asparagin und Glutamin war aus zweierlei Hinsicht von besonderem Interesse. Erstens wurden diese Aminosäuren wie OAS spezifisch von YdeD-überproduzierenden Zellen ausgeschieden und zweitens erfolgte dies bereits während des exponentiellen Wachstums, einer Phase, in der die Zellen normalerweise einen ausgeglichenen und aufeinander abgestimmten Aminosäurestoffwechsel haben.

Betrachtet man nun die Exkretion von Asparagin und Glutamin während verschiedener Wachstumsphasen, kann man für beide Verbindungen einen ähnlichen Verlauf erkennen (Abb. 22). In der exponentiellen Phase erfolgte die stärkste Exkretion, die sich aber schon in

der frühstationären Phase verlangsamte und im Falle von Glutamin kam es zu diesem Zeitpunkt sogar schon zur Wiederaufnahme in die Zelle. Im weiteren Verlauf wurde Glutamin schließlich vollständig reabsorbiert und auch Asparagin wurde zumindest teilweise wiederaufgenommen. Glutamin erreichte eine Maximalkonzentrationen im Medium von etwa 1,2 mM, Asparagin etwa 3,2 mM.

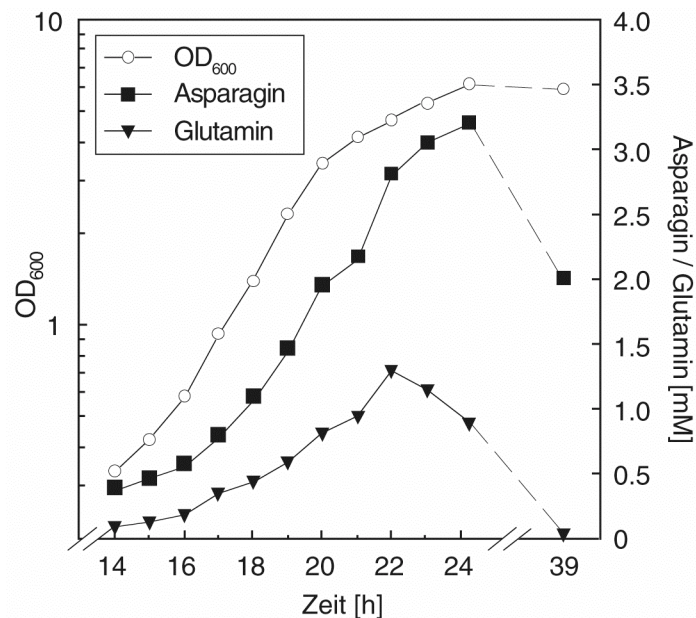


Abbildung 22: Verlauf der Asparagin- und Glutamin-Exkretion bei YdeD-Überproduktion. Die Bestimmung des Asparagin- und Glutamin-Gehalts im Medium von YdeD-überproduzierenden Zellen erfolgte nach Derivatisierung der Aminosäuren mit OPA (vgl. Abb. 21). Dazu wurden Überstände derselben Kultur wie in der Legende zu Abbildung 14 beschrieben verwendet.

6.2. Exkretionsprodukte der spätstationären Phase

Die in den Abbildungen 12A und 21 gezeigten Elutionsprofile beschreiben die Situation in der logarithmischen und frühstationären Wachstumsphase von YdeD-überproduzierenden Zellen. In der spätstationären Phase änderte sich dann die Zusammensetzung der im Medium vorhandenen Verbindungen nochmals deutlich (Abb. 23). Der Asparagin- und Glutamin-Gehalt war merklich gesunken. Zusätzlich war nun Asparaginsäure vorhanden, die wahrscheinlich mittels einer der Asparaginase von *E. coli* (Campbell *et al.*, 1967) aus dem zuvor ausgeschiedenen und reabsorbierten Asparagin gebildet wurde.

Eine weitere Verbindung, die in dieser Phase allerdings auch bei den Kontrollzellen zu finden war, ist die γ -Aminobuttersäure (GABA). GABA kann aus Glutaminsäure mit Hilfe der Glutaminsäure-Decarboxylase gebildet werden, damit die Zellen unter sauren Bedingungen einen physiologisch verträglichen pH-Wert aufrechterhalten können (Smith *et al.*, 1992).

Spezifisch für YdeD-überproduzierende Zellen unter den gegebenen Anzuchtbedingungen war dagegen das Vorhandensein von α -Aminobuttersäure (ABA), welche aus α -Ketobutyrat in einer von der Transaminase C (*avtA*-Genprodukt) katalysierten Reaktion gebildet wird (Rudman und Meister, 1953). Diese Reaktion dient bekanntermaßen der Entgiftung von α -Ketobutyrat, das bei übermäßiger Akkumulation toxisch wird, da es als Pyruvat-Analogon wirken kann (Barak *et al.*, 1987). Unter den gegebenen Bedingungen verhinderte vermutlich das in hoher Konzentration vorhandene Valin (ca. 5 mM) als effektiver Inhibitor der Acetohydroxysäure-Synthasen I und III die weitere Metabolisierung von α -Ketobutyrat zu Isoleucin (Leavitt und Umbarger, 1962), was schließlich zur Akkumulation von α -Ketobutyrat führte.

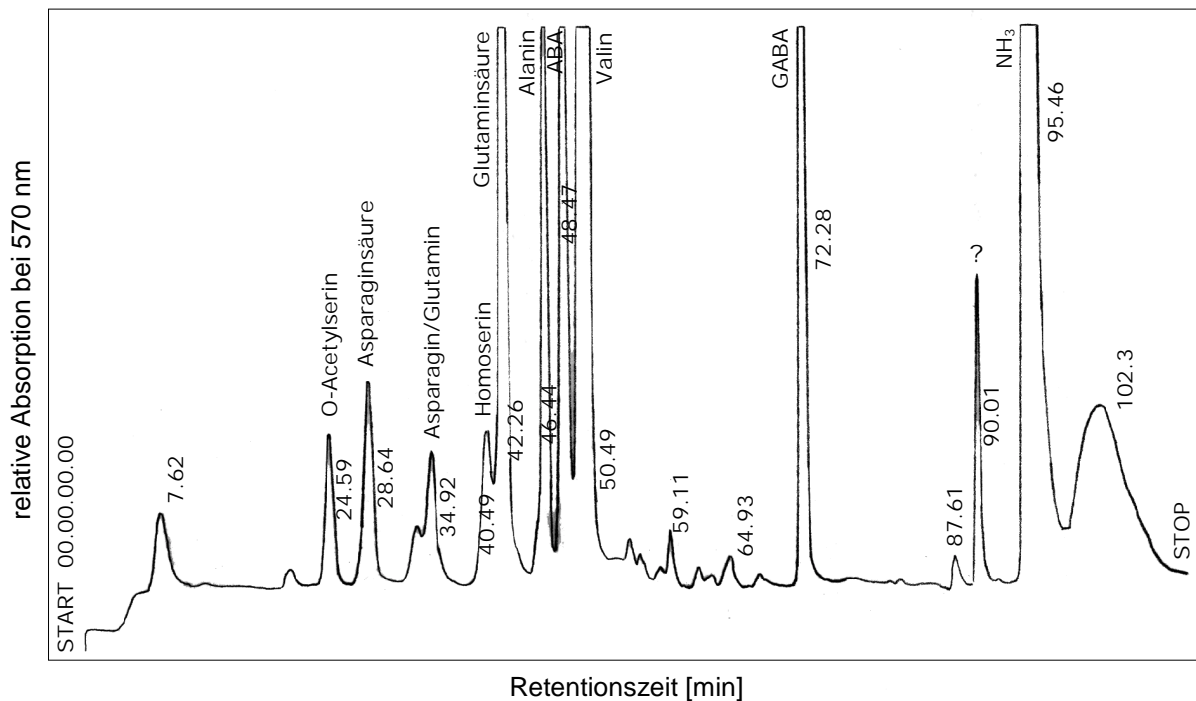


Abbildung 23: Analyse des Mediums einer spätstationären Kultur von YdeD-überproduzierenden Zellen. Gezeigt ist das Elutionsprofil des Kulturüberstandes von W3110 pkP291 aus Abbildung 12A nach 39 h Wachstum. Die Aufarbeitung und Analyse der Probe erfolgte mittels des Aminosäure-Analysators wie in der Legende zu Abbildung 12 beschrieben.

6.3. Wachstum nach Supplementation mit aliphatischen Aminosäuren

In früheren Experimenten war beobachtet worden, daß sich YdeD-überproduzierende Zellen bei Wachstum in LB-Vollmedium weder in der Wachstumsrate noch in dem maximalen Zellertrag von den Kontrollzellen unterschieden (Daten nicht gezeigt). Dagegen war für das Wachstum von YdeD-überproduzierenden Zellen in Minimalsalzmedium die Supplementation mit reduzierten S-Verbindungen eine unerläßliche Voraussetzung (s. Abb. 9). Dennoch

konnte selbst nach Zugabe von Cystin nie die maximale Zelldichte, die von den Kontrollzellen erreicht wurde, erzielt werden (s. Abb. 10).

Ein Mangel an Glukose, die in allen Experimenten als Kohlenstoff-Quelle diente, konnte ausgeschlossen werden, da selbst nach 38 h Inkubation noch mehr als 3 g/l im Medium nachweisbar waren. Im Gegensatz dazu hatten die Kontrollzellen die Glukose schon deutlich früher vollständig verbraucht.

Die Beobachtung, daß YdeD-überproduzierende Zellen nicht nur OAS und Cystein, sondern auch noch eine Reihe anderer Aminosäuren ausscheiden, ließ vermuten, daß die Ursache für diesen Wachstumsdefekt möglicherweise im zusätzlichen Mangel einer oder mehrerer Aminosäuren zu suchen war. Deshalb wurden erneut Wachstumsexperimente durchgeführt, bei denen das SM1-Medium nun zusätzlich zu den S-Quellen Thiosulfat und Methionin noch mit weiteren Aminosäuren, entweder einzeln oder in Kombination, supplementiert worden war.

Dabei fiel auf, daß der Zusatz von Verbindungen, die von YdeD-überproduzierenden Zellen ausgeschieden werden, wie beispielsweise Asparagin, Glutamin oder ABA, den Zellertrag nicht wesentlich verbessern konnte (Daten nicht gezeigt).

Durch die gemeinsame Supplementation der zwei aliphatischen Aminosäuren Isoleucin und Leucin konnten jedoch Zellerträge, die mit denen der Kontrollzellen vergleichbar waren, erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Eine ähnliche Beobachtung war auch bei dem Cystein-Produktionsstamm gemacht worden: Auch hier kann das Wachstum in Minimalmedium durch Supplementation mit Methionin, Leucin und Isoleucin verbessert werden (T. Maier, persönliche Mitteilung).

7. Azaserin-Resistenz bei YdeD-Überproduktion

Azaserin, ein Aminosäurederivat und Strukturanalogon von OAS (Hulanika *et al.*, 1979) und Glutamin (Buchanan, 1982), wirkt als Inhibitor einiger glutamin-abhängiger Enzyme in der Purin-Synthese und ist unter bestimmten Anzuchtbedingungen schon bei geringer Konzentration toxisch (Williams und Tritz, 1977). Deshalb war es interessant, die Wirkung von Azaserin auf YdeD-überproduzierende Zellen zu untersuchen.

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Azaserin wurde das Wachstum des Stammes W3110 pKP291 bzw. pACYC184-LH entweder in LB-Medium oder in SM1-Minimalmedium in Gegenwart verschiedener Azaserin-Konzentrationen getestet.

YdeD-überproduzierende Zellen zeigten sowohl in Vollmedium als auch in Minimalmedium eine signifikant höhere Resistenz gegen Azaserin als die Kontrollzellen (Tab. 9). Die allgemein höhere Resistenz im Vollmedium läßt sich dadurch erklären, daß der toxische

Effekt von Azaserin durch die Präsenz verschiedener Aminosäuren verringert werden kann (Williams und Tritz, 1977).

Tabelle 9: Einfluß der YdeD-Überproduktion auf die Azaserin-Resistenz

Stamm / Plasmid	MHK von Azaserin (mM)	
	LB-Medium	SM1-Medium ^a
W3110 pACYC184-LH	1,3	0,5
W3110 pKP291 (<i>ydeD</i>)	> 2,6	1,0

a. Das SM1-Medium enthielt neben Thiosulfat noch 10 % LB-Medium (v/v).

Azaserin gelangt vermutlich mittels des allgemeinen Aufnahmesystems für aromatische Aminosäuren AroP in die Zelle (Williams *et al.*, 1980). Da gezeigt werden konnte, daß die Aufnahme der aromatischen Aminosäure Phenylalanin durch die YdeD-Überproduktion nicht beeinflusst wird (s. Abb. 19), darf man annehmen, daß die Ursache für die erhöhte Resistenz der YdeD-überproduzierenden Zellen nicht auf einer verminderten Azaserin-Aufnahme beruhte.

Azaserin stellt aufgrund seiner Ähnlichkeit zu OAS auch ein gutes Substrat für die beiden O-Acetylserin-Sulphydri-lasen CysK und CysM dar (Hulanika *et al.*, 1979). Dabei kann Azaserin mit Sulfid zu Cystein und Diazoessigsäure umgesetzt werden, wobei letztere Verbindung für die Zellen toxisch ist (Hulanika *et al.*, 1979).

Da in YdeD-überproduzierenden Zellen das Cystein-Regulon nicht so stark induziert ist wie bei den Kontrollzellen, könnte die Ursache für eine erhöhte Resistenz gegen Azaserin in der schwächeren Expression der *cysK*- und *cysM*-Gene liegen, was wiederum eine verminderte Diazoessigsäure-Bildung zur Folge hätte. Um dies auszuschließen, wurde die Azaserin-Resistenz der *cysK-cysM*-Doppelmutante W3110 Δ KM untersucht, da hier die Bildung der toxischen Diazoessigsäure grundsätzlich nicht mehr möglich war.

Für diesen Ansatz war der Stamm W3110 Δ KM außerdem noch mit dem Plasmid pTG29 transformiert worden, einem Derivat von pKP291, das neben dem *ydeD*-Gen auch noch das *cysEX*-Allel unter der Kontrolle des nativen *cysE*-Promotors enthält (Winterhalter und Leinfelder, 1997). Das *cysEX*-Gen codiert für eine Serin-Transacetylase, die nicht mehr durch Cystein gehemmt werden kann, was eine deregulierte und damit verstärkte OAS-Synthese zur Folge hat. Unter der Annahme, daß diese Zellen somit einen höheren internen OAS-Spiegel besitzen als Zellen ohne das zusätzliche *cysEX*-Allel, müßte dies auch Auswirkungen auf die Resistenz gegen Azaserin haben. Wenn das postulierte Modell mit YdeD als Exporter von verschiedenen Aminosäuren und Azaserin richtig ist, sollte OAS bei

höherer Konzentration verstärkt mit Azaserin um den YdeD-vermittelten Efflux konkurrieren, was zu einem verminderten Azaserin-Export und damit zu einer erhöhten Azaserin-Sensitivität führen würde. Um diese These zu testen, wurde die Azaserin-Resistenz in analoger Weise zu dem oben beschriebenen Verfahren untersucht.

Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 24 dargestellt. Es konnte zwar keine eindeutige MHK bestimmt werden, da alle Stämme selbst bei 1 mM Azaserin noch Wachstum zeigten, dennoch war mit steigender Azaserin-Konzentration ein deutlicher Unterschied in der maximal erreichten Zelldichte zwischen den Stämmen zu beobachten. Dabei war der Stamm mit pKP291 (*ydeD*) erneut deutlich resistenter als die Kontrolle mit pACYC184-LH, was bedeutet, daß die erhöhte Azaserin-Resistenz in YdeD-überproduzierenden Zellen nicht durch eine verminderte Diazoessigsäure-Bildung verursacht wurde. Der Stamm mit pTG29 (*ydeD*, *cysEX*) zeigte ein intermediäres Resistenzniveau, was gut mit der oben vorgeschlagenen Hypothese übereinstimmt, daß die Azaserin-Sensitivität mit einem höheren internen OAS-Spiegel wieder steigt.

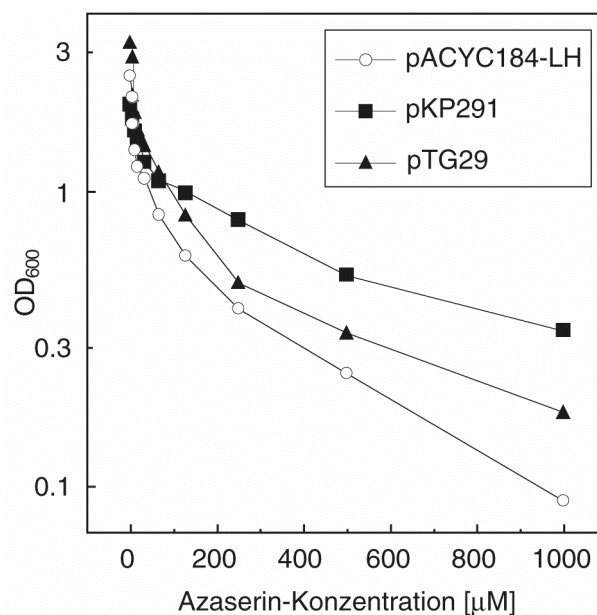


Abbildung 24: Azaserin-Resistenz von W3110 Δ KM bei YdeD-Überproduktion. Die Anzucht erfolgte in SM1-Medium, das mit 2% LB-Medium und 0,5 mM Cystin supplementiert worden war.

8. Ansätze zur Charakterisierung der Funktion von YdeD in Wildtypzellen

Neben der Charakterisierung der physiologischen Folgen, die durch eine artifizielle Überproduktion von YdeD hervorgerufen werden, sollte desweiteren die natürliche Funktion des *ydeD*-Genprodukts in einem *E. coli*-Wildtypstamm untersucht werden. Wäre diese Funktion bekannt, könnte man möglicherweise die Aktivität des Proteins gezielt im Hinblick auf den Cystein-Fermentationsprozeß verändern.

Für die Analyse der natürlichen Funktion von YdeD wurden zwei prinzipiell verschiedene Wege beschritten. Zum einen wurde der Phänotyp einer chromosomalen *ydeD*-Mutante untersucht und zum anderen sollte die Regulation der Expression des *ydeD*-Gens mit Hilfe einer Reporter-gen-Fusion charakterisiert werden. Dadurch bekäme man Einblick in die Bedingungen, unter denen das YdeD-Protein gebildet wird, woraus wiederum eine mögliche physiologische Funktion für YdeD abgeleitet werden könnte.

8.1. Phänotypische Charakterisierung einer *ydeD*-Insertionsmutante

Bei der Konstruktion der chromosomalen *ydeD*-Mutante V324 Δ 299 wurde das *ydeD*-Gen des Stammes V324 (*recD*) durch Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette in die einzige *MluI*-Schnittstelle des Gens zerstört (Daßler *et al.*, 2000). Da die Charakterisierung dieser *ydeD*-Mutante aber in einem Stamm mit einem definierten genetischen Hintergrund erfolgen sollte, wurde zunächst das zerstörte *ydeD*-Allel mittels P1-Transduktion (Miller, 1992) aus V324 Δ 299 in den Stamm MC4100 übertragen. Durch PCR-Analyse unter Verwendung der Oligonukleotide TD17 und TD18 wurde der korrekte Austausch des *ydeD*-Wildtypallels gegen das *ydeD::kan*-Allel bestätigt. Der resultierende Stamm wurde mit MC4100 Δ 299 bezeichnet.

Auf der Suche nach einem meßbaren Phänotyp der *ydeD*-Mutante MC4100 Δ 299 wurde das Wachstumsverhalten unter verschiedenen Bedingungen getestet und mit dem *ydeD*-Wildtyp verglichen. Neben dem normalen Wachstum in LB-Vollmedium und in M9-Minimalsalzmedium unter aeroben wie anaeroben Bedingungen, wurde auch das Verhalten bei plötzlicher Einwirkung eines externen Streßfaktors untersucht. Dazu wurde beispielsweise die Inkubationstemperatur unvermittelt von 37 °C auf 21 °C abgesenkt oder auf 44 °C angehoben.

In anderen Versuchen wurden die Zellen in ein Medium mit einer sehr hohen oder einer sehr geringen K⁺- oder Na⁺-Ionen-Konzentration überführt und somit einem osmotischen Schock ausgesetzt, um zu überprüfen, ob YdeD ähnlich wie postulierte oder bekannte Transporter (Meury, 1988; Jebbar *et al.*, 1992) oder mechanosensitive Membrankanäle (Schleyer *et al.*, 1993; Cui *et al.*, 1995; Berrier *et al.*, 1992) möglicherweise an der Osmoregulation beteiligt ist.

Desweiteren wurde untersucht, ob YdeD nicht nur bei artifizierlicher Überproduktion, sondern auch unter Wildtypbedingungen, eventuell als eine Art Entgiftungssystem an der Exkretion von Metaboliten des Cystein-Stoffwechsels beteiligt ist. Der Bedarf für einen solchen Entgiftungsmechanismus wäre z. B. in einer Situation gegeben, wenn den Zellen nach einer Phase des S-Mangels unvermittelt eine gute S-Quelle wie Sulfat oder Thiosulfat zur Verfügung steht, was eine rapide Cystein-Synthese zur Folge hätte (Übersicht in Kredich, 1996). Entsprechend dieser Überlegung sollte eine *ydeD*-Mutante bei einem Wechsel der S-Quelle von beispielsweise Djenkolat zu Sulfat oder Thiosulfat einen deutlichen Nachteil haben, da ihr das potentielle Entgiftungssystem fehlt. Ähnliches gilt auch für ein unvermitteltes Angebot von OAS in hoher Konzentration.

In allen Versuchen konnte jedoch kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen der *ydeD*-Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), was vermuten läßt, daß - zumindest unter den getesteten Laborbedingungen - das YdeD-Protein nicht essentiell für das Zellwachstum ist.

8.2 Charakterisierung der *ydeD*-Expression mittels einer Reporter-gen-Fusion

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse der natürlichen Funktion eines unbekanntes Proteins besteht darin, Bedingungen zu identifizieren, unter denen das entsprechende Gen verstärkt exprimiert wird. Um die Expression des *ydeD*-Gens zu untersuchen, wurden *ydeD-lacZ*-Fusionen verwendet.

8.2.1. Konstruktion einer transkriptionellen und einer translationalen *lacZ*-Fusion mit der Promotorregion von *ydeD*

Zunächst wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide TD24 und TD25 und der chromosomalen DNA von MC4100 als Matrize ein 215 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, das sich über den putativen Promotorbereich des *ydeD*-Gens von Position -194 bis +21 relativ zu dessen Translationsstart erstreckt (Abb. 25). Dabei setzte das Oligonukleotid TD24 direkt am Startcodon des *ydeF*-Gens an, das relativ zum *ydeD*-Gen in inverser Orientierung auf dem Chromosom liegt. Über die in den Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* (TD24) und *BamHI* (TD25) wurde das Fragment in die ebenfalls mit *EcoRI/BamHI* geschnittenen Vektoren pRS551 und pRS552 (Simons *et al.*, 1989) kloniert. Im Falle von pRS551 entstand dabei eine Transkriptionsfusion zwischen der *ydeD*-Promotorregion und dem vollständigen *lacZ*-Gen inklusive dessen Ribosomenbindestelle, was bedeutet, daß die Expression des *lacZ*-Gens nur über die Transskriptionseffizienz des *ydeD*-Promotors reguliert wird. Das resultierende Plasmid wurde mit pTK299 bezeichnet. Im Falle von pRS552 entstand eine Translationsfusion, bei der das 5'-terminal trunkierte *lacZ*-

Gen (es fehlen die ersten acht Codons) im korrekten Leseraster hinter die ersten sieben Codons des *ydeD*-Gens gesetzt worden war. Bei dem Fusionsplasmid pTL299 ist die Expression des *lacZ*-Gens nicht nur von der Transkriptionseffizienz des *ydeD*-Promotors, sondern auch von der Stärke der Translationsstartsignale des *ydeD*-Gens abhängig. Durch Sequenzanalyse mit Hilfe des Oligonukleotids REG7B wurde die Richtigkeit der klonierten Sequenzen bestätigt.

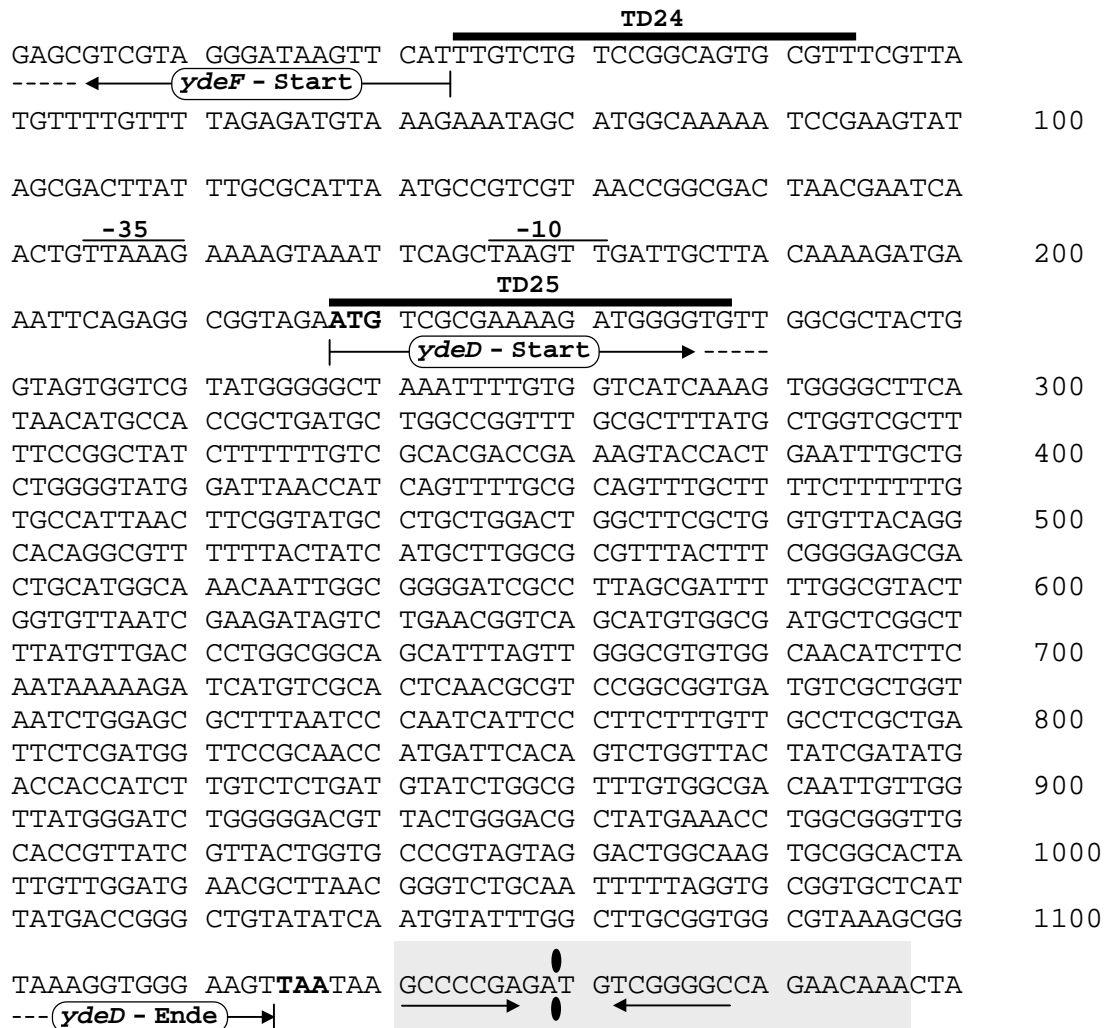


Abbildung 25: DNA-Sequenz des *ydeD*-Gens und der stromaufwärts gelegenen Region. Das Start- und Stoppcodon des *ydeD*-Gens ist jeweils fettgedruckt dargestellt. Durch dünne Überstreichungen ist jeweils die -35-Box und die -10-Box mit der besten Homologie zur Konsensussequenz von σ^{70} -Promotoren angedeutet. Der schattierte Bereich enthält die Terminatorregion von *ydeD*, eine palindromische GC-reiche Sequenz (unterstrichen; die beiden Ovale markieren dabei die Spiegelebene) gefolgt von einer AT-reichen Sequenz. Die beiden fettgedruckten Überstreichungen markieren die Paarungsbereiche der Oligonukleotide TD24 und TD25, die für die Amplifizierung der putativen Promotorregion des *ydeD*-Gens verwendet wurden. Desweiteren ist der Start des Gens *ydeF* markiert.

8.2.2. Integration der *ydeD-lacZ*-Fusionen in das Chromosom von *E. coli* MC4100

Um mit der *ydeD*-Promotorregion hinsichtlich ihrer Kopienzahl pro Zelle möglichst nahe an der Wildtypsituation zu sein und um Effekte zu vermeiden, die möglicherweise durch eine unterschiedliche Kopienzahl der Plasmide unter verschiedenen Bedingungen hervorgerufen werden könnten, wurden die *ydeD-lacZ*-Fusionen auf das Chromosom des Stammes MC4100 (*lacZ*) gebracht. Diese Integration erfolgte mit Hilfe des Phagen λ in die λ -Integrationsstelle des *E. coli*-Chromosoms. Dazu wurden die mit pTK299 bzw. pTL299 transformierten Zellen von MC4100 mit λ RS45 (Simons *et al.*, 1989) infiziert. Die resultierenden Phagenlysate wurden zur Transduktion von *E. coli* MC1061 verwendet. Nach Reinigung der Phagenlinien mittels Selektion der Transduktanten auf ihre Kanamycin-Resistenz bzw. ihre *lacZ*-Aktivität auf MacConkey-Indikatorplatten wurden die integrierten Phagen wieder aus dem Chromosom freigesetzt. Die auf diese Weise gereinigten rekombinanten Phagenlinien λ TK299 und λ TL299 dienten nun zur Infizierung von MC4100-Zellen. Die resultierenden Stämme M41TK bzw. M41TL tragen die chromosomal integrierten Fusionen.

8.2.3. Effekt des Transkriptionsaktivators MarA auf die Expression einer *ydeD'-lacZ*-Fusion

Der von Cohen *et al.* (1993) beschriebene *mar*-locus von *E. coli*, in dessen unmittelbarer Nachbarschaft das *ydeD*-Gen lokalisiert ist (s. Einleitung, Abb. 2), enthält unter anderem das Gen für den Transkriptionsaktivator MarA. Eine Überexpression des *marA*-Gens führt zum Phänotyp der multiplen Antibiotika-Resistenz (Gambino *et al.*, 1993). Dabei reguliert das MarA-Protein die Expression einer Vielzahl von Genen (Jair *et al.*, 1995), darunter auch die des AcrAB-Systems (Okusu *et al.*, 1996), das als Efflux-Pumpe für eine Reihe von Antibiotika fungiert und den Zellen damit eine gewisse Resistenz verleiht.

Da das *ydeD*-Gen zum einen in direkter Nachbarschaft des *mar*-locus' liegt und zum anderen für ein Membranprotein codiert, das am Efflux verschiedener Verbindungen beteiligt ist, stellte sich als erstes die Frage, ob die Expression von *ydeD* nicht auch durch den Transkriptionsaktivator MarA reguliert wird. Um diese Hypothese zu testen, wurde das *marA*-Gen zunächst kloniert und dann dessen Effekt auf die Expression der *ydeD'-lacZ*-Transkriptionsfusion untersucht.

Das *marA*-Gen wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide TD20 (enthält eine *Bam*HI-Schnittstelle) und TD21 und der chromosomalen DNA von MC4100 als Matrize amplifiziert. Nach Restriktion des 0,74 kb langen Fragments mit *Bam*HI und *Pvu*II erfolgte die Ligation mit dem 3,8 kb-Fragment des *Bam*HI/*Nru*I-geschneitenen Vektors pBR322, wobei die Tetracyclin-Resistenzdeterminante des Vektors zerstört wurde. Die Expression des

marA-Gens wird in diesem Konstrukt (pMarA) von dem starken konstitutiven Promotor des Tetracyclin-Resistenzgens initiiert (Gambino *et al.*, 1993). Für Kontrollzwecke wurde die Tetracyclin-Resistenzdeterminante von pBR322 durch Deletion eines internen *EcoRV/NruI*-Fragments (0,79 kb) inaktiviert. Zellen, die das Plasmid pMarA enthielten, waren fähig, im Unterschied zu den Kontrollzellen mit dem Plasmid pBR Δ tet, in Gegenwart von Chloramphenicol (10 μ g/ml) zu wachsen. Aufgrund dieser zusätzlichen Chloramphenicol-Resistenz wurde bestätigt, daß das *marA*-Gen im Konstrukt pMarA funktionell exprimiert wird.

Um den Einfluß des MarA-Proteins auf die Expression der *ydeD-lacZ*-Fusionen zu testen, wurden die Stämme M41TK und M41TL jeweils mit den Plasmiden pMarA bzw. pBR Δ tet transformiert. Die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität von exponentiell wachsenden Zellen erfolgte nach Anzucht in LB-Medium, wobei jedoch kein signifikanter Unterschied im Expressionsniveau der *ydeD'-lacZ*-Transkriptionsfusion zwischen den MarA-Überproduzenten und den Kontrollzellen festzustellen war. Die β -Galaktosidase-Aktivitäten lagen gleichermaßen bei etwa 80 Miller-Einheiten. Daraus muß man schließen, daß die Expression des *ydeD*-Gens nicht vom Transkriptionsaktivator MarA abhängig ist.

Bei der Bestimmung der Expression der *ydeD'-lacZ*-Translationsfusion konnten aber - unabhängig von der MarA-Überproduktion - nur β -Galaktosidase-Aktivitäten mit maximal ein bis zwei Miller-Einheiten gemessen werden. Aus diesem Grund erfolgten alle weiteren Studien mit dem Stamm M41TK, bei dem deutlich höhere Aktivitäten nachweisbar waren.

Die Ursache dafür, daß die Transkriptionsfusion merklich höhere β -Galaktosidase-Aktivitäten lieferte als die Translationsfusion, liegt vermutlich in der unterschiedlichen Shine-Dalgarno-Sequenz der jeweiligen Konstrukte. Dabei stellt nicht nur die Basenabfolge dieser Sequenz, sondern auch deren Abstand zum Startcodon eine kritische Größe für die Expressionseffizienz eines Gens dar. Bei der Transkriptionsfusion liegt die Ribosomenbindestelle sieben Basenpaare stromaufwärts des Startcodons des *lacZ*-Gens und stimmt so mit dem Konsensusabstand gut überein (Steitz, 1979). Im Unterschied dazu beträgt der Abstand zwischen der putativen Ribosomenbindestelle und dem Startcodon des chimären *ydeD'-lacZ*-Gens bei der Translationsfusion nur drei Basenpaare (s. Abschnitte 1.2. und 8.2.1.), weshalb dieses Translationsstartsignal offensichtlich nur eine schwache Expression zuläßt.

8.2.4. Expression des *ydeD*-Gens unter verschiedenen Anzuchtbedingungen

Aufgrund der Erkenntnis, daß die Expression des *ydeD*-Gens nicht von MarA reguliert wird, wurde im weiteren Verlauf getestet, ob die Expression möglicherweise durch andere Faktoren oder bestimmte Wachstumsbedingungen beeinflusst wird.

Da die Überproduktion des YdeD-Proteins aufgrund des damit verbundenen Efflux von OAS und Cystein erhebliche Auswirkungen auf den Schwefelmetabolismus hat, wurde untersucht, ob die Expression des *ydeD*-Gens als Teil des Cystein-Regulons in Abhängigkeit von der S-Quelle reguliert wird. Dazu wurde der Stamm M41TK mit den Plasmiden pACYC184-LH (Kontrolle) oder pH58 bzw. pH59 transformiert. Diese Plasmide sind Derivate von pACYC184-LH, wobei pH58 das Wildtyp-*cysB*-Allel enthält, während pH59 das Gen für den konstitutiven Aktivator CysB^c trägt. In beiden Konstrukten wird das jeweilige *cysB*-Gen konstitutiv exprimiert (T. Maier, persönliche Mitteilung).

Die Anzucht dieser Stämme erfolgte in SM1-Medium, das neben 10% LB-Anteil wahlweise noch mit Thiosulfat oder Cystin supplementiert worden war (vgl. Abb. 10). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke der *ydeD*-*lacZ*-Fusion beobachtet werden. Auf allen S-Quellen und unabhängig von der Präsenz der verschiedenen *cysB*-Allele wurden β -Galaktosidase-Aktivitäten von 60-75 Miller-Einheiten gemessen, was bedeutet, daß das *ydeD*-Gen offensichtlich nicht Teil des Cystein-Regulons ist.

Um zu testen, ob ein Überangebot der Hauptexkretionsprodukte Asparagin, Glutamin und OAS die Bildung des Efflux-Proteins YdeD induzieren kann, erfolgte die Anzucht von M41TK in SM1-Minimalmedium, dem die genannten Aminosäuren einzeln oder in Kombination (jeweils ad 2 mM) zugesetzt worden waren. Auch hier konnte in keinem Fall eine signifikante Veränderung der *ydeD*-Expression im Vergleich zur Kontrolle ohne Supplemente nachgewiesen werden.

Vergleicht man allerdings die *ydeD*-Expression von Zellen, die entweder in SM1-Medium oder LB-Medium angezogen worden waren, ist ein signifikanter Unterschied festzustellen: In Minimalmedium ist die Expression der *ydeD*-*lacZ*-Fusion etwa doppelt so stark (150 Miller-Einheiten) wie in Vollmedium (70 Miller-Einheiten).

Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß das *ydeD*-Gen möglicherweise in Abhängigkeit von der Wachstumsrate exprimiert wird oder daß die Verfügbarkeit bestimmter Komponenten im Medium die *ydeD*-Expression beeinflusst.

D. DISKUSSION

Die Sequenzierung von inzwischen fast 30 bakteriellen Genomen erbrachte, daß offensichtlich eine Vielzahl der Gensequenzen für putative Transmembranproteine codiert (Saier, 2000; Aleshin *et al.*, 1999). Von einem Großteil dieser Membranproteine ist bekannt oder es wird zumindest für sie postuliert, daß sie an der Aufnahme von Verbindungen in die Zelle beteiligt sind (Pao *et al.*, 1998). Transportsysteme, die den Efflux von Molekülen vermitteln, sind dagegen weniger gut charakterisiert (Harley und Saier, 2000), obwohl auch sie eine wichtige Funktion in der Zelle haben. So sind beispielsweise verschiedene Exportsysteme für toxische Verbindungen wie Schwermetalle, Antibiotika oder Lösungsmittel bekannt, die den Zellen als Entgiftungsmechanismen dienen und ihnen dadurch eine höhere Resistenz verleihen (Silver, 1996; Okusu *et al.*, 1996, White *et al.*, 1997).

Seit einigen Jahren häufen sich nun aber auch Berichte über Effluxsysteme für normale Metabolite des Zellstoffwechsels wie Aminosäuren und Zucker. Beispiele für Aminosäure-Transporter sind dabei das LysE-Protein von *Corynebacterium glutamicum*, das am Export von Lysin beteiligt ist (Vrljic *et al.*, 1996) und die Proteine der RhtB-Familie in *E. coli*, die den Efflux von Homoserin, Homoserinlacton, Threonin und anderen Aminosäuren vermitteln (Zakataeva *et al.*, 1999). Diese Exporter gehören alle zu einer relativ einheitlichen Familie von Membranproteinen (Aleshin *et al.*, 1999). Für *E. coli* wurden desweiteren mehrere Zucker-Effluxsysteme beschrieben, wie der Arabinose-Exporter YdeA (Bost *et al.*, 1999) sowie die Transporter SetA und SetB, die den Efflux von Glucose, Lactose sowie verschiedener Glucoside und Galactoside vermitteln (Liu *et al.*, 1999b).

Im Gegensatz zu Exportsystemen für toxische Verbindungen, bei denen die physiologische Funktion auf der Hand liegt, ist der Efflux wichtiger zellulärer Metabolite durch spezifische Transporter oder Kanäle in vielen Fällen noch nicht verstanden (Buettner *et al.*, 1973; Liu *et al.*, 1999a; Zakataeva *et al.*, 1999).

1. YdeD, ein neuartiges Effluxsystem für Aminosäuren

Bei dem Versuch, die Produktionsleistung eines Cystein-Produktionsstammes von *E. coli* zu verbessern, war ein bis dato nicht-charakterisierter offener Leserahmen identifiziert worden, der bei Überexpression die Cystein-Ausbeute deutlich steigern konnte. Dabei handelte es sich um den *ydeD*-Genlocus bei min 34 des *E. coli*-Chromosoms.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß das *ydeD*-Gen für ein integrales Membranprotein codiert, das am Efflux von bestimmten Aminosäuren beteiligt ist. Ein Primärsequenz-Vergleich erbrachte, daß YdeD jedoch nicht in die bekannte LysE/RhtB-Familie von Aminosäure-Exportern eingeordnet werden kann (Aleshin *et al.*, 1999). Vielmehr ist YdeD der erste umfassend charakterisierte Vertreter der PecM-Familie, die mit mehr als

40 Mitgliedern eine Vielzahl von putativen Effluxsystemen für Aminosäuren oder deren Derivate umfaßt (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/lists?upflist.txt>). Die ubiquitäre Verbreitung von Proteinen der PecM-Familie bei Gram-negativen und Gram-positiven Eubakterien sowie bei Cyanobakterien und im Reich der Archaea weist auf eine wichtige Funktion dieser potentiellen Effluxsysteme unter den verschiedensten Lebensbedingungen dieser Organismengruppen hin.

2. Physiologische Konsequenzen der YdeD-Überproduktion

2.1. Exponentielle Wachstumsphase

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, daß die Überproduktion von YdeD in Stämmen mit einer deregulierten Cystein-Biosynthese zu einer deutlichen Steigerung der Cystein- und N-Acetylserin (NAS)-Produktion führt (Winterhalter und Leinfelder, 1997). Überraschenderweise stellte sich nun heraus, daß auch *E. coli*-Wildtypstämme bei YdeD-Überproduktion eine Reihe von Aminosäuren ausscheiden, die man normalerweise nicht im Medium dieser Zellen findet. O-Acetylserin (OAS), Asparagin und Glutamin waren die Hauptexkretionsprodukte während der exponentiellen Wachstumsphase, was eine direkte Beteiligung von YdeD an deren Efflux nahelegt (Abb. 26).

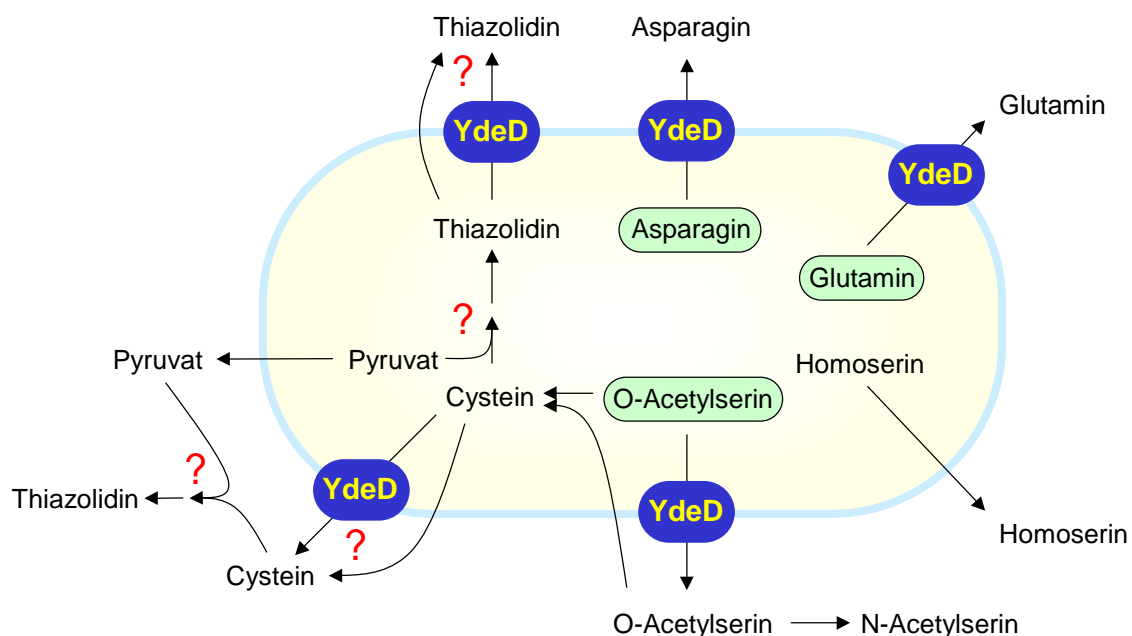


Abbildung 26: Schematische Darstellung einer *E. coli*-Zelle bei YdeD-Überproduktion. Die Hauptexkretionsprodukte während der exponentiellen Wachstumsphase sind hervorgehoben. Prozesse, deren Ablauf oder Lokalisation noch unklar ist, wurden entsprechend kenntlich gemacht.

Für die Zellen hatte dieser YdeD-vermittelte Aminosäure-Efflux einige gravierende physiologische Konsequenzen, die allerdings ausschließlich auf den übermäßigen Export von OAS zurückgeführt werden konnten. OAS erfüllt in der Zelle zwei wesentliche Aufgaben: Erstens dient es als direkter Vorläufer von Cystein und zweitens entsteht daraus in einer rein chemischen Reaktion der Induktor des Cystein-Regulons, nämlich NAS. Ein intrazellulärer OAS-Mangel zieht demnach aus zwei Gründen einen Cystein-Mangel nach sich, was wiederum zu einem Wachstumsdefekt in Minimalmedium führt.

Die Messung des Induktionsstatus' des Cystein-Regulons erbrachte, daß bei YdeD-Überproduktion durch den OAS-Efflux und dem daraus resultierenden intrazellulären NAS-Mangel das Cystein-Regulon nicht induziert und damit die Fähigkeit zur Sulfat-Reduktion stark beeinträchtigt war. Nachdem Thiosulfat aber direkt als S-Donor im letzten Schritt der Cystein-Biosynthese dienen kann, war der Schwefeleinbau und damit ein zumindest mäßiges Wachstum auch bei einem nicht- oder nur schwach-induzierten Cystein-Regulon möglich.

Zur Wiederherstellung der vollen Wachstumsfähigkeit war jedoch die zusätzliche Supplementation von Methionin nötig. Dies ist dadurch zu erklären, daß OAS auch die metabolische Vorstufe für Cystein darstellt und daß durch den OAS-Mangel der große Cystein-Bedarf der Zelle vor allem für die Methionin-Biosynthese nur unzureichend gedeckt werden konnte. Von drei Cystein-Molekülen werden nämlich fast zwei der Methionin-Synthese zugeführt (Neidhardt *et al.*, 1990). Der intrazelluläre Cystein-Mangel konnte logischerweise aber auch durch Supplementation allein mit Cystin wieder behoben werden.

Eine weitere Aminosäure, die neben den bereits genannten ebenfalls schon in der frühen Wachstumsphase in das Medium ausgeschieden wurde, ist Homoserin (Abb. 26). Diese Verbindung wurde aber wahrscheinlich nicht direkt durch YdeD, sondern durch den Homoserin-Exporter RhtB ausgeschleust (Zakataeva *et al.*, 1999), und zwar als sekundäre Folge einer anderen Exportaktivität von YdeD: Aufgrund des YdeD-vermittelten OAS-Efflux mußte das Medium wie beschrieben mit Methionin supplementiert werden. Der Zusatz von Methionin, einem Inhibitor der Homoserin-Transsuccinylase MetA (Abb. 27) (Savin *et al.*, 1972), bewirkt aber, daß die Bildung von O-Succinylhomoserin gedrosselt wird und es so zunächst zur Akkumulation und schließlich zur Exkretion von Homoserin kam. Daß die unter den gleichen Bedingungen kultivierten Kontrollzellen kein Homoserin ausschieden, ist dadurch zu erklären, daß hier die Homoserin-Bildung durch das in ausreichender Menge selbst synthetisierte Cystein reguliert wird. Durch seine Aktivität als Inhibitor der Homoserin-Dehydrogenase ThrA (Datta, 1967) verhinderte das Cystein die übermäßige Akkumulation von Homoserin (Abb. 27).

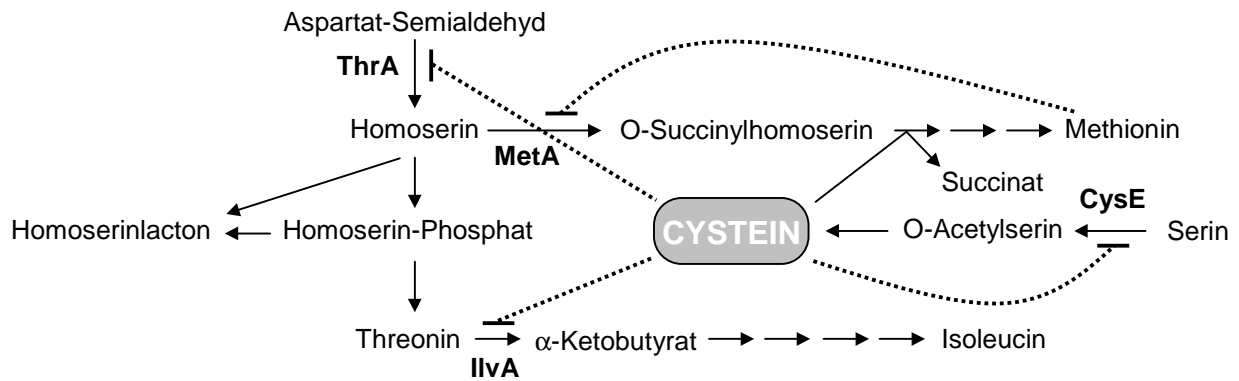


Abbildung 27: Schematische Darstellung der regulatorischen Rolle von Cystein im Aminosäure-Stoffwechsel. Die Hemmung einzelner Enzyme durch Cystein und Methionin ist durch gepunktete Linien dargestellt.

2.2. Frühstationäre Wachstumsphase

Mit dem Übergang in die stationäre Phase begannen YdeD-überproduzierende Zellen die spezifische Exkretion von Cystein. Es konnte gezeigt werden, daß dieser Cystein-Efflux eng mit der Wiederaufnahme des zuvor ausgeschiedenen OAS gekoppelt ist. Der Befund, daß die Zellen das OAS wieder aufnehmen, erklärt nun, warum das zunächst nicht-induzierte Cystein-Regulon in der späteren Phase wieder angeschaltet werden konnte.

Dabei liegt die Ursache für die Reabsorption von OAS höchstwahrscheinlich in einer Verringerung der Wachstumsrate. Dies wiederum führt zu einem geringeren Aminosäure-Bedarf für die Proteinsynthese und entsprechend häufen sich diese Verbindungen vorübergehend in der Zelle an. Da die Serin-Transacetylase CysE einer äußerst effektiven Feedback-Inhibition durch Cystein unterliegt ($K_i = 1,1 \mu\text{M}$; Kredich und Tomkins, 1966), wird die OAS-Synthese abrupt gestoppt. Vorhandenes OAS wird jedoch weiter zu Cystein umgesetzt, so daß der intrazelluläre OAS-Spiegel derart absinkt, daß keine Exkretion mehr erfolgen kann und es zu einer Nettoaufnahme des zuvor extrazellulär akkumulierten OAS kommt.

Das nun unreguliert gebildete Cystein hemmt neben CysE nun auch die Homoserin-Dehydrogenase ThrA (Datta, 1967) und die Threonin-Deaminase IlvA (Harris, 1981), wodurch die Bildung essentieller Intermediate des Isoleucin-Biosynthesewegs (Homoserin und α -Ketobutyrat) verhindert wird (Abb. 27) (Harris und Lui, 1981). Deshalb konnte das Wachstum durch zusätzliche Supplementation von Isoleucin und Leucin verbessert werden. Dieser Befund deckt sich mit der Beobachtung von McIver und Tapsall (1987), die zeigten, daß der Wachstumsdefekt bei übermäßig angebotenen Cystein durch gemeinsame Zugabe der drei verzweigt-kettigen Aminosäuren behoben werden kann.

Die Ursache für die ursprüngliche Verringerung der Wachstumsrate könnte entweder im Mangel eines bestimmten Metaboliten liegen oder aber in der übermäßigen Akkumulation von Homoserin. Bekanntermaßen kann aus Homoserin und Homoserin-Phosphat jeweils Homoserinlacton gebildet werden (Abb. 27), was wiederum ein Signalmolekül für den Eintritt in die stationäre Phase darstellt (Jakubowski und Goldman, 1992; Huisman und Kolter, 1994).

Die Frage, in welcher Form das Cystein von den Zellen ausgeschieden wird, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Dabei sind prinzipiell drei Möglichkeiten denkbar: Cystein wird ausgeschleust a) als freie Aminosäure, b) gebunden im Thiazolidin und c) in Form von Cystin. Das hohe Reduktionspotential in der Zelle spricht allerdings dagegen, daß es schon dort zur Bildung von Cystin kommt, so daß diese Transportform wohl ausscheidet. Die intrazelluläre Bildung von Thiazolidin wäre dagegen durchaus denkbar, da im Cytoplasma sowohl Pyruvat als auch Cystein in ausreichender Menge vorliegen und auf nicht-enzymatische Weise miteinander reagieren können (Abb. 26) (Sullivan und Hess, 1937). Die Thiazolidin-Bildung in der Zelle könnte einen *in situ*-Schutzmechanismus gegen die übermäßige Präsenz freier Sulfhydryl-Gruppen darstellen (Wlodek *et al.*, 1993), wenn Cystein plötzlich unreguliert gebildet oder im Überschuß angeboten wird.

Da jedoch im Kulturüberstand von *E. coli* unter den gegebenen Anzuchtbedingungen, unabhängig von einer YdeD-Überproduktion, auch eine große Menge freies Pyruvat zu finden war, wäre eine extrazelluläre Thiazolidin-Bildung ebenfalls denkbar, was allerdings die Präsenz von freiem Cystein im Medium voraussetzen würde (Abb. 26). Die These, daß die Zellen das Cystein als freie Aminosäure ausscheiden, wird dadurch gestützt, daß unter geeigneten Fermentationsbedingungen im Kulturüberstand des Cystein-Produktionsstammes kaum Thiazolidin nachweisbar ist. Hier liegt das Cystein aufgrund der starken Belüftung während der Fermentation überwiegend in seiner oxidierten Form als Cystin vor (T. Maier, persönliche Mitteilung).

3. Substrate für YdeD

Neben der OAS-Exkretion während der exponentiellen Wachstumsphase sprechen auch die *in vivo*-Transportversuche mit [¹⁴C]-OAS eindeutig dafür, daß es sich bei YdeD um ein Effluxsystem für diese Aminosäure handelt. Vergleicht man nun OAS mit Asparagin und Glutamin, zwei weiteren spezifischen Exkretionsprodukten während der exponentiellen Phase, so sind bei OAS und Glutamin einerseits und bei Glutamin und Asparagin andererseits strukturelle Ähnlichkeiten in der Seitenkette festzustellen (Abb. 28). Daher ist es naheliegend, daß vermutlich alle drei Aminosäuren von YdeD als Substrate erkannt und transportiert werden können. Auch die erhöhte Resistenz von YdeD-überproduzierenden

Zellen gegenüber Azaserin, dem Strukturanalogon von OAS und Glutamin (Abb. 28), paßt gut in das Bild, daß YdeD ein Effluxsystem für OAS und strukturell verwandte Verbindungen darstellt. Ein ähnlich breites Substratspektrum charakterisiert auch den Aminosäure-Exporter RhtB (Zakataeva *et al.*, 1999) und das Zucker-Effluxsystem SetA (Liu *et al.*, 1999b) von *E. coli*.

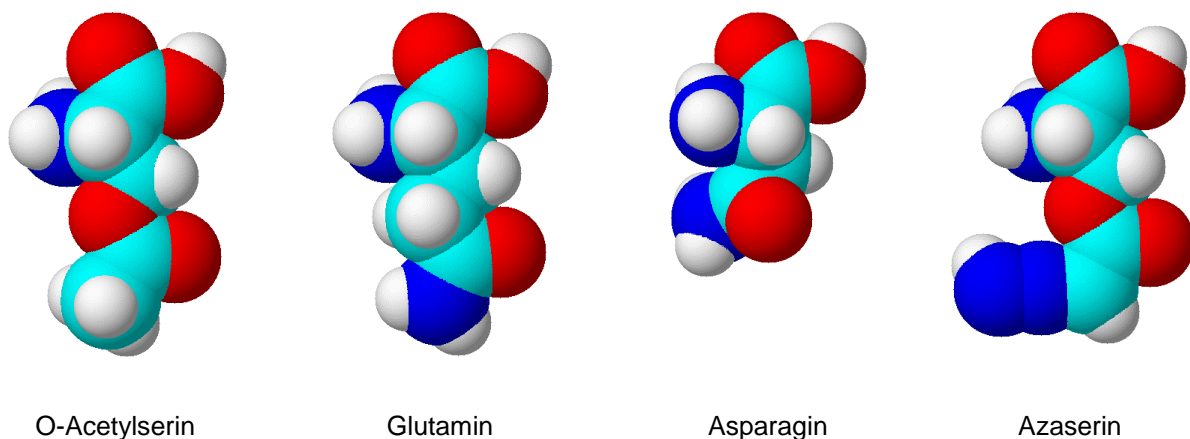


Abbildung 28: Räumliche Darstellung von O-Acetylserin und strukturell verwandter Verbindungen. Farbcode der Atome: C (türkis), O (rot), N (blau), H (weiß).

Nachdem Asparagin von allen spezifisch durch YdeD ausgeschiedenen Aminosäuren die höchste Konzentration im Medium erreicht, wäre es denkbar, daß es sich dabei um das bevorzugte Substrat von YdeD handelt.

4. Rolle von YdeD in der Cystein-Produktion

Der Befund, daß es erst nach Wiederaufnahme von OAS zur Exkretion von Cystein kommt, deutet daraufhin, daß der zentrale Beitrag von YdeD zur Cystein-Produktion in der primären Ausschleusung von OAS liegt. Dies wurde ferner daran deutlich, daß Wildtypzellen auch ohne YdeD-Überproduktion nach externer Zugabe von OAS in der Lage waren, Cystein auszuscheiden. Dennoch darf daraus nicht zwangsläufig abgeleitet werden, daß YdeD ausschließlich indirekt über den primären OAS-Export an der Cystein-Produktion beteiligt ist. Denn dadurch, daß durch den Efflux von OAS den Zellen zunächst der Vorläufer für die Cystein-Synthese fehlt, kann es während dieser Phase logischerweise noch nicht zur Cystein-Exkretion kommen.

Bei den *in vivo*-Transportstudien hatte die Überproduktion von YdeD eine verminderte Cystin-Nettoaufnahme zur Folge, was ähnlich wie bei OAS durch einen erhöhten, YdeD-vermittelten Efflux von Cystein erklärt werden könnte. Allerdings war bei diesen Transportversuchen auch beobachtet worden, daß Aminosäuren wie Threonin und Isoleucin,

die nicht von YdeD-überproduzierenden Zellen ausgeschieden werden, ebenfalls mit verminderter Rate aufgenommen wurden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser noch widersprüchlichen Ergebnisse ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine eindeutige Aussage darüber möglich, ob YdeD nur indirekt über den OAS-Export oder doch auch unmittelbar am Efflux von Cystein beteiligt ist (Abb. 26). Diese Frage läßt sich nur durch Transportstudien an invertierten Membranvesikeln klären, da mit diesem System der *in vivo*-Efflux einer Substanz direkt als *in vitro*-Aufnahme gemessen werden kann (Rosen und Tsuchiya, 1979).

Aus der Beobachtung, daß eine *ydeD*-Insertionsmutante des Cystein-Produktionsstammes weiterhin genausoviel Cystein produziert wie der entsprechende *ydeD*-Wildtyp (Daten nicht gezeigt), muß man schließen, daß YdeD, wenn es denn direkt am Cystein-Efflux beteiligt ist, zumindest nicht das einzige Cystein-Exkretionssystem in *E. coli* darstellt. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, daß noch zwei weitere unbekannte putative Membranproteine identifiziert werden konnten, die die Cystein-Ausbeute des Produktionsstammes deutlich verbessern (T. Maier, persönliche Mitteilung). Aufgrund der engen Kopplung der Cystein-Exkretion mit der OAS-Aufnahme wäre für den Cystein-Export ein OAS/Cystein-Antiport-Mechanismus mittels eines dieser putativen Effluxsysteme denkbar. Die Voraussetzungen für diesen speziellen Transport-Mechanismus, nämlich die stöchiometrische Umwandlung des Substrats in das Produkt sowie eine strukturelle Ähnlichkeit beider Verbindungen, wären zumindest gegeben (Poolman, 1990).

Der beschriebene Efflux von Cystein stellt einen elementaren Mechanismus zur Entgiftung dieser Aminosäure dar, da eine übermäßige Akkumulation für die Zellen toxisch ist (Sørensen und Pedersen, 1991; Delaney *et al.*, 1992). *E. coli* besitzt zwar mit der L-Cystein-Desulhydrase (Guarneros und Ortega, 1970) und der L-Tryptophanase (Snell, 1975) zwei Enzyme für den Abbau von L-Cystein zu Pyruvat, Ammonium und Sulfid, allerdings spielt diese Art der Entsorgung der Aminosäure unter den gegebenen Bedingungen wohl nur eine untergeordnete Rolle: Die Synthese der L-Tryptophanase wird nämlich nur in Gegenwart von L-Tryptophan induziert (Snell, 1975) und unterliegt zudem der Katabolitrepression durch Glukose (Happold und Hoyle, 1936). Die Bildung der L-Cystein-Desulhydrase erfolgt ebenfalls nicht konstitutiv, sondern sie wird erst durch L-Cystein oder L-Cystin induziert, wobei die maximale L-Cystein-Desulhydrase-Aktivität in *E. coli* nur etwa 20% im Vergleich zu der in *S. typhimurium* beträgt (Guarneros und Ortega, 1970). Desweiteren wäre eine übermäßige Desulhydrierung des unter den gegebenen Bedingungen in großer Menge gebildeten Cysteins problematisch, da das entstehende Sulfid schon in geringer Konzentration toxisch ist, indem es eine Vielzahl von Enzymen hemmt (Dixon und Webb, 1964). Deshalb stellt der

Efflux von Cystein im Vergleich zum Abbau dieser Aminosäure den bevorzugten Entgiftungsmechanismus dar.

5. Rolle von YdeD im Wildtyp

5.1. Expression des *ydeD*-Gens

Mit Hilfe einer Reporter-gen-Fusion konnte gezeigt werden, daß das *ydeD*-Gen nur äußerst schwach exprimiert wird. Betrachtet man allerdings die Promotor-Region des *ydeD*-Gens, ist dieses Resultat nicht überraschend, da die putativen -35 und -10-Regionen (TTAAAG bzw. TAAGTT) nur geringe Homologie zu den entsprechenden Konsensussequenzen von σ^{70} -Promotoren (TTGACA bzw. TATAAT) aufweisen (s. Abb. 25).

Für das in der Nachbarschaft des *mar*-locus liegende *ydeA*-Gen (s. Abb. 2), das für ein Arabinose-Exportsystem codiert (Bost *et al.*, 1999), wurde ebenfalls nur ein äußerst schwacher Promoter identifiziert. Auch für die *set*-Gene von *E. coli*, die für verschiedene Zucker-Effluxsysteme codieren, konnte nur eine schwache Expression unter den standardmäßigen Kultivierungsbedingungen festgestellt werden (Liu *et al.*, 1999b).

Die Expression der Gene vieler bakterieller Effluxsysteme wird durch ihre Substrate induziert (Paulsen *et al.*, 1996b, Liu *et al.*, 1999b). Die bei YdeD-Überproduktion auftretenden Hauptexkretionsprodukte Asparagin, Glutamin und OAS waren aber nicht in der Lage, die *ydeD*-Expression nennenswert zu beeinflussen. Daher ist nicht auszuschließen, daß der richtige niedermolekulare Induktor erst noch identifiziert werden muß.

Für das *ydeA*-Gen wurde mit Hilfe eines DNA-Macroarrays nachgewiesen, daß dessen Expression durch den Transkriptionsaktivator MarA moduliert werden kann, wobei MarA eine ca. zwei- bis vierfache Steigerung der Expression bewirkte (Barbosa und Levy, 2000). Ein Einfluß von MarA auf die Expression des *ydeD*-Gens war in jenem Ansatz jedoch nicht zu beobachten, wodurch wiederum das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde. Dennoch erscheint es plausibel, daß für *ydeD* ebenfalls ein Transkriptionsaktivator existiert, dessen molekulare Natur allerdings noch einer experimentellen Identifizierung bedarf.

Die schwache Modulation der *ydeD*-Expression in Abhängigkeit von der Nährstoffverfügbarkeit unterliegt möglicherweise einer allgemeinen Regulation und erinnert entfernt an die Expression einiger Gene, die im Rahmen des globalen Regelkreises der stringenten Kontrolle reguliert werden (Quay und Oxender, 1979; Stephens *et al.*, 1975). Auch diese Gene werden bei ausreichender Versorgung mit Aminosäuren nur schwach, bei einem Mangel jedoch verstärkt exprimiert. Der physiologische Sinn einer verstärkten Produktion des Aminosäure-Effluxsystems YdeD unter Aminosäure-Mangelbedingungen ist allerdings nicht offensichtlich.

Wie die verschiedenen Beispiele von Metaboliten-Effluxsystemen zeigen, ist offenbar die schwach-konstitutive bzw. in engen Grenzen regulierte Expression der entsprechenden Gene ein allgemeines Prinzip, das die Zellen vor einem übermäßigen Verlust an wertvollen Metaboliten bewahrt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich dies eindrucksvoll daran, daß *ydeD* im Wildtyp nur äußerst schwach exprimiert wurde und daß die artifizielle Überexpression des Gens eine massive OAS-Exkretion zur Folge hatte, weshalb das Wachstum in Minimalmedium nicht mehr möglich war.

5.2. YdeD-Mutante

Die *ydeD*-Insertionsmutante zeigte unter allen getesteten Bedingungen keinen besonderen Phänotyp. Eine ähnliche Beobachtung war auch für Mutanten von *ydeA* (Bost *et al.*, 1999) bzw. von *setA*, *setB* und *setC* (Liu *et al.*, 1999b) gemacht worden. Offensichtlich ist *ydeD* unter Laborbedingungen nicht essentiell für das Wachstum von *E. coli*. Möglicherweise wurden nur noch nicht die geeigneten Streßbedingungen identifiziert, unter denen *ydeD*⁺-Zellen einen Vorteil gegenüber der Mutante haben. Eine andere Erklärung wäre, daß *ydeD* im Wildtyp unter allen Bedingungen nur so schwach exprimiert wird, daß die biochemische Konsequenz unterhalb der Meßbarkeitsgrenze liegt und so sein Fehlen in der Mutante nicht auffällt.

6. Offene Fragen

Über den genauen Mechanismus, wie der spezifische Aminosäure-Efflux bei *E. coli* durch das Membranprotein YdeD vermittelt wird, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekulieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen jedoch nahe, daß es sich bei dem YdeD-Protein, entsprechend der Carrier-Hypothese von Krämer (1994b), um einen Kanal oder Exporter handelt, durch den selektiv verschiedene Aminosäuren ausgeschieden werden können. Ob es sich dabei nun um eine osmotisch kontrollierte Pore (Luntz *et al.*, 1986) oder einen energiegetriebenen Transporter (Bröer und Krämer, 1991a; Bröer und Krämer, 1991b) handelt, ist derzeit noch unklar. Diese Frage müßte jedoch durch *in vitro*-Transportexperimente mit invertierten Membranvesikeln zu klären sein.

Auch die Frage nach der physiologischen Funktion des Aminosäure-Effluxsystems YdeD muß noch offen bleiben. Es wäre jedoch denkbar, daß YdeD eine Art Entgiftungsmechanismus für bestimmte Aminosäuren oder deren Derivate darstellt und dadurch den Zellen das Wachstum oder das Überleben unter bestimmten Streßbedingungen ermöglicht. Nachdem Cystein schon in geringer Konzentration das Wachstum von *E. coli* hemmt (Sørensen und Pedersen, 1991; Delaney *et al.*, 1992), könnte ein Effluxsystem für OAS einer

übermäßigen intrazellulären Akkumulation von Cystein entgegenwirken und somit die Zelle vor einer Vergiftung schützen.

Für den Lysin-Exporter LysE von *C. glutamicum* konnte eine essentielle Rolle bei der Entgiftung von Lysin nach Wachstum auf lysin-reichen Peptiden nachgewiesen werden (Eggeling und Sahm, 1999; Vrljic *et al.*, 1996). Da *C. glutamicum* Lysin nicht verwerten kann, wird auf diese Weise eine Vergiftung mit dieser Aminosäure verhindert. Ob YdeD in *E. coli* eine ähnliche Funktion bei Wachstum auf Peptiden oder Aminosäure-Gemischen mit unausgewogener Zusammensetzung übernimmt, ist allerdings fraglich, da die Hauptexkretionsprodukte entweder als Kohlenstoff- und/oder als Stickstoff-Quelle verwertet werden können (Asparagin, Glutamin) (Hartman, 1973; Willis und Woolfolk, 1974; Masters und Hong, 1981) oder wie im Falle von OAS gar nicht Bestandteil von Peptiden sind.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Der bei einem Genbank-Screening identifizierte Genlocus *ydeD* kann bei Überexpression die Ausbeute eines Cystein-Produktionsstammes von *Escherichia coli* deutlich verbessern. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das bisher unbekannte *ydeD*-Gen möglichst umfassend in seiner Biochemie und Physiologie zu charakterisieren, um damit einen Beitrag zur Steigerung der Cystein-Produktion zu liefern. Folgende Ergebnisse wurden dabei erhalten:

1. Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem *ydeD*-Genprodukt um ein integrales Membranprotein handelt, das zu einer neuen Familie von putativen Effluxsystemen gehört. Desweiteren wurde das Translationsstartcodon des Gens eindeutig bestimmt.
2. Die Überproduktion von YdeD führte in Wildtypstämmen von *E. coli* dazu, daß das Wachstum in Minimalmedium erst nach Supplementation mit Thiosulfat und Methionin möglich war. Es wurde gezeigt, daß die Ursache für die Unfähigkeit zur Sulfat-Reduktion in einem intrazellulären N-Acetylserin-Mangel lag, der wiederum auf eine übermäßige O-Acetylserin (OAS)-Exkretion zurückgeführt werden konnte.
In einer späteren Wachstumsphase erfolgte die Wiederaufnahme des zuvor ausgeschiedenen OAS, welches in der Zelle zu Cystein umgesetzt und anschließend wieder ausgeschieden wurde. Somit war gezeigt, daß der entscheidende Beitrag des *ydeD*-Genprodukts zur Cystein-Produktion in der primären Exkretion von OAS liegt.
Die Frage, wie das Cystein nun ausgeschleust wird, ob als freie Aminosäure oder gebunden in der 2-Methyl-2,4-Thiazolidindicarbonsäure, der Form, in der das Cystein im Medium nachgewiesen wurde, mußte allerdings offen bleiben.
3. Bei der Analyse des Mediums nach Wachstum von YdeD-überproduzierenden Zellen wurden neben OAS und Cystein noch Asparagin und Glutamin als weitere spezifische Exkretionsprodukte identifiziert. Dieses Ergebnis sowie die strukturellen Ähnlichkeiten bei OAS, Glutamin und Asparagin, den Hauptexkretionsprodukten während der exponentiellen Wachstumsphase, legen nahe, daß es sich bei YdeD um einen Kanal oder einen energiegetriebenen Exporter für diese Verbindungen handelt. Ob auch Cystein ein direktes Substrat für YdeD darstellt, wird diskutiert.
4. Eine *ydeD*-Mutante zeigte keinen signifikanten Phänotyp, woraus man schließen muß, daß das Gen - zumindest unter den getesteten Bedingungen - nicht essentiell für *E. coli* ist.

5. Über die mögliche physiologische Funktion des *ydeD*-Genprodukts kann derzeit nur spekuliert werden, allerdings erscheint eine YdeD-vermittelte Aminosäure-Exkretion als Entgiftungsmechanismus unter bestimmten Streßbedingungen durchaus plausibel.

LITERATURVERZEICHNIS**A**

Aleshin, V. V., N. P. Zakataeva und V. A. Livshits (1999), *Trends. Biochem. Sci.* 24, 133-135.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman (1997), *Nucl. Acids Res.* 25, 3389-3402.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidmann, J. A. Smith und K. Struhl (Hrsg., 1997), *Current protocols in molecular biology*, J. Wiley & Sons, Inc.

B

Barak, Z., D. M. Chipman und N. Gollop (1987), *J. Bacteriol.* 169, 3750-3756.

Barbosa, T. M. und S. B. Levy (2000), *J. Bacteriol.* 182, 3467-3474.

Berger, E. A. und L. A. Heppel (1972), *J. Biol. Chem.* 247, 7684-7694.

Berrier, C., A. Coulombe, I. Szabo, M. Zoratti und A. Ghazi (1992), *Eur. J. Biochem.* 206, 559-565.

Bielinska, A. und D. Hulanicka (1986), *Acta Biochim. Pol.* 33, 133-137.

Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley *et al.* (1997), *Science* 277, 1453-1474.

Bloom, H., H. Beier und H. S. Gross (1987), *Electrophoresis* 8, 93-99.

Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Geene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, H. W. Boyer, J. H. Crosa und S. Falkow (1977), *Gene* 2, 95-113.

Bost, S., F. Silva und D. Belin (1999), *J. Bacteriol.* 181, 2185-2191.

Bröer, S. und R. Krämer (1991a), *Eur. J. Biochem.* 202, 131-135.

Bröer, S. und R. Krämer (1991b), *Eur. J. Biochem.* 202, 137-143.

Brown, K. (1970), *J. Bacteriol.* 104, 177-188.

Buchanan, J. M. (1982), *Methods Enzymol.* 87, 76-84.

Buettner, M. J., E. Spitz und H. V. Rickenberg (1973), *J. Bacteriol.* 114, 1068-1073.

Burkovski, A., und R. Krämer (1999), *BIOforum* 6, 338-341.

C

Campball, H. A., L. T. Mashburn, E. A. Boyse und L. J. Old (1967), *Biochemistry* 6, 721-730.

Casadaban, M. J. (1980), *J. Mol. Biol.* 138, 179-180.

Casadaban, M. J. und S. N. Cohen (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4530-4533.

Charpentier, B. und C. Branlant (1994), *J. Bacteriol.* 176, 830-839.

Chung, C. T., S. L. Niemela und R. H. Miller (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2172-2175.

Cohen, S. P., H. Hächler und S. B. Levy (1993), *J. Bacteriol.* 175, 1484-1492.

Colyer, T. E. und N. M. Kredich (1994), *Mol. Microbiol.* 13, 797-805.

Cui, C., D. O. Smith und J. Adler (1995), *J. Membr. Biol.* 144, 31-42.

D

Daßler, T., T. Maier, C. Winterhalter und A. Böck (2000), *Mol. Microbiol.* 36, 1101-1112.

Datta, P. (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 635-641.

Delaney, J. M., D. Ang und C. Georgopoulos (1992), *J. Bacteriol.* 174, 1240-1247.

Denk, D. und A. Böck (1987), *J. Gen. Microbiol.* 133, 515-525.

Dixon, M. und E. C. Webb (1964), *Enzymes*, 2. Auflage, Longmans, Green und Co., London.

Dollery, C. (1991), *Therapeutic Drugs*, Churchill Livingstone.

E

Eggeling, L. und H. Sahm (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 146-153.

F

Flavin, M. und C. Slaughter (1965), *Biochemistry* 4, 1370-1375.

Funane, K., H. Iwahashi und T. Nakamura (1987), *Agric. Biol. Chem.* 51, 1247-1256.

G

Gaitonde, M. K. (1967), *Biochem. J.* 104, 627-633.

Gambino, L., S. J. Gracheck und P. F. Miller (1993), *J. Bacteriol.* 175, 2888-2894.

Guarneros, G. und M. V. Ortega (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 198, 132-142.

H

Hama, H., T. Shimamoto, M. Tsuda und T. Tsuchiya (1988), *J. Bacteriol.* 170, 2236-2239.

Happold, F. C. und L. Hoyle (1936), *Br. J. Exp. Pathol.* 17, 136-143.

Harinder, K. und G. S. Bains (1988), *Nahrung* 32, 481-490.

Harley, K. T. und M. H. Saier Jr. (2000), *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 195-198.

Harris, C. L. (1981), *J. Bacteriol.* 145, 1031-1035.

Harris, C. L. und L. Lui (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1145-1151.

Hartman, S. C. (1973), in S. Prusiner und E. R. Stadtman (Hrsg.): *The Enzymes of Glutamine Metabolism*. Academic Press, Inc., New York.

Hikita, M., M. Horikawa und T. Mori (1975), *J. Radiat. Res.* 16, 162-172.

Hryniewicz, M. M. und N. M. Kredich (1991), *J. Bacteriol.* 173, 5876-5886.

Huisman, G. W. und R. Kolter (1994), *Science* 265, 537-539.

Hulanika, D. M., S. G. Hallquist, N. M. Kredich und T. Mojica-A (1979), *J. Bacteriol.* 140, 141-146.

J

Jair, K.-W., R. G. Martin, J. L. Rosner, N. Fujita, A. Ishihama und R. E. Wolf Jr. (1995), *J. Bacteriol.* 177, 7100-7104.

Jakubowski, H. und E. Goldman (1992), *Microbiol. Rev.* 56, 412-429.

Jebbar, M., R. Talibart, K. Gloux, T. Bernard und C. Blanco (1992), *J. Bacteriol.* 174, 5027-5035.

Jensen, K. F. (1993), *J. Bacteriol.* 175, 3401-3407.

K

Kaur, M. und G. S. Bains (1980), *Nahrung* 24, 813-820.

Kolbeck, W. (1995), *Praxis (Chemie)* 44, 2.

Kolbeck, W. (1996), *Prax. Naturwiss. Chem.* 45, 20-24.

Krämer, R. (1994a), *Arch. Microbiol.* 162, 1-13.

Krämer, R. (1994b), *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 75-94.

Kredich, N. M. (1996) in F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik *et al.* (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular biology.*, 2. Auflage, ASM Press, Washington, D.C.

Kredich, N. M. und G. M. Tomkins (1966), *J. Biol. Chem.* 241, 4955-4965.

Kyte, J. und R. F. Doolittle (1982), *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.

L

Laemmli, U. K. (1970), *Nature* 227, 680-685.

Larson, T. J., G. Schumacher und W. Boos (1982), *J. Bacteriol.* 152, 1008-1021.

Leavitt, R. I. und H. E. Umbarger (1962), *J. Bacteriol.* 83, 624-630.

Ledl, F. und E. Schleicher (1990), *Angew. Chemie* 102, 597-626.

Leive, L. und B. Davis (1965), *J. Biol. Chem.* 240, 4362.

Liu, J. Y., P. F. Miller, M. Gosink und E. R. Olson (1999a), *Mol. Microbiol.* 31, 1845-1851.

Liu, J. Y., P. F. Miller, J. Willard und E. R. Olson (1999b), *J. Biol. Chem.* 274, 22977-22984.

Low, B. (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60, 160-167.

Luntz, M. G., N. I. Zhdanova und G. I. Bourd (1986), *J. Gen Microbiol.* 132, 2137-2146.

Lyons, L. B. und N. D. Zinder (1972), *Virology* 49, 45-60.

M

- Masters**, P. S. und J.-S.Hong (1981), *J. Bacteriol.* 147, 805-819.
- Mclver**, C. J. und J. W. Tapsall (1987), *Pathology* 19, 361-363.
- Meury**, J. (1988), *Arch. Microbiol.* 149, 232-239.
- Miller**, J. H. (1972), *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Miller**, J. H. (1992), *A short course in bacterial genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Monroe**, R. S., J. Ostrowski, M. M. Hryniewicz und N. M. Kredich (1990), *J. Bacteriol.* 172, 6919-6929.
- Morton**, J. D., P. Akroyd und C. G. May (1961), Neth. Patent 97 515.

N

- Nakamura**, T., H. Iwahashi und Y. Eguchi (1983), *J. Bacteriol.* 158, 1122-1127.
- Narita**, K. (1959), *J. Am. Chem. Soc.* 81, 1751-1756.
- Neidhardt**, F. C., J. L. Ingraham und M. Schaechter (1990), *Physiology of the Bacterial Cell*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Newman**, G. W., M. K. Balcewicz-Sablina, J. R. Guarnaccia, H. G. Remold und D. S. Silberstein (1994), *J. Exp. Med.* 180, 359-363.

O

- Okusu**, H., D. Ma und H. Nikaido (1996), *J. Bacteriol.* 178, 306-308.
- Ostrowski**, J. und N. M. Kredich (1989), *J. Bacteriol.* 171, 130-140.
- Ostrowski**, J. und N. M. Kredich (1990), *J. Bacteriol.* 172, 779-785.
- Ostrowski**, J. und N. M. Kredich (1991), *J. Bacteriol.* 173, 2212-2218.

P

- Pandan**, E., T. Arbel, A. Rimon, A. B. Shira und A. Cohen (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 5666-5673.
- Pao**, S. S., I. T. Paulsen und M. H. Saier Jr. (1998), *Mol. Biol. Rev.* 62, 1-34.
- Paulsen**, I. T., M. H. Brown und R. A. Skurray (1996), *Microbiol. Rev.* 60, 575-608.
- Pi**, J., P. J. Wookey und A. J. Pittard (1991) *J. Bacteriol.* 173, 3622-3629.
- Pittard**, A. J. (1996) in F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik *et al.* (Hrsg.): *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular biology.*, 2. Auflage, ASM Press, Washington, D.C.
- Poolman**, B. (1990), *Mol. Microbiol.* 4, 1629-1636.
- Pouchelle**, E. und P. Sadoul (1980), *Am. Rev. Respir. Diss.* 122, 808-809.

Pugsley, A. P. (1993), *Microbiol. Rev.* 57, 50-108.

Q

Quay, S. C. und D. L. Oxender (1979), *J. Bacteriol.* 137, 1059-1062.

Reverchon, S., W. Nasser und J. Robert-Baudouy (1994), *Mol. Microbiol.* 11, 1127-1139.

Rosen, B. P. und T. Tsuchiya (1979), *Meth. Enzymol.* 56, 233-241.

R

Rudman, D. und A. Meister (1953), *J. Biol. Chem.* 200, 591-604.

S

Saier, M. H. Jr. (2000), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 354-411.

Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (Hrsg., 1989), *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Sano, K., K. Yokozeki, F. Tamura, N. Yasuda, I. Noda und K. Mitsugi (1977), *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 806.

Savin, M. A., M. Flavin und C. Slaughter (1972), *J. Bacteriol.* 111, 547-556.

Schleyer, M., R. Schmid und E. P. Bakker (1993), *Arch. Microbiol.* 160: 424-431.

Schmidt, K., S. Liaanen-Jensen und H. G. Schlegel (1963), *Arch. Microbiol.* 46, 117-126.

Schubert, M. P. (1937), *J. Biol. Chem.* 121, 539-548.

Shaffner, A. L. (1963), *Ann. NY Acad. Sci.* 106, 298-310.

Shine, J. und L. Dalgarno (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1342-1346.

Silhavy, T. J., M. L. Berman und L. W. Enquist (Hrsg., 1984), *Experiments with gene fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Silver, S. (1996), *Gene* 179, 9-19.

Simons, R. W., F. Houman und N. Kleckner (1987), *Gene* 53, 85-96.

Smith, D. K., T. Kassam, B. Singh und J. F. Elliot (1992), *J. Bacteriol.* 174, 5820-5826.

Snell, E. E. (1975), *Adv. Enzymol.* 42, 287-333.

Soda, K., H. Tanaka und N. Esaki (1983) in H.-J. Rehm und G. Reed (Hrsg.): *Biotechnology: A Comprehensive Treatise in 8 Volumes*, Verlag Chemie, Weinheim, Vol. 3.

Sørensen, M. A. und S. Pedersen (1991), *J. Bacteriol.* 173, 5244-5246.

Stahl, E. (Hrsg., 1967), *Dünnschichtchromatographie*, Springer (Berlin).

Stephens, J. C., S. W. Artz und B. N. Ames (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4389-4393.

Steitz, J. A. (1979) in Chambliss, L. und M. Nomura (Hrsg.), *Ribosomes. Structure, Function and Genetics*, University Park Press.

Sulavik, M. C., M. Dazer und P. F. Miller (1997), *J. Bacteriol.* 179, 1857-1866.

Sullivan, M. X. und W. C. Hess (1937), *J. Biol. Chem.* 122, 11-17.

Suppmann, B. und G. Sawers (1994), *Mol. Microbiol.* 11, 965-82.

Szczepkowski, T. W. (1958), *Nature* 182, 934-935.

T

Tabor, S. und C. C. Richardson (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1074-1078.

Tormay, P. (1996), Dissertation am Institut für Genetik und Mikrobiologie, LMU München.

V

Vrljic, M., H. Sahm und L. Eggeling (1996), *Mol. Microbiol.* 22, 815-826.

W

Wheldrake, J. F. (1967), *Biochem. J.* 105, 697-699.

White, D. G., J. D. Goldman, B. Demple und S. B. Levy (1997), *J. Bacteriol.* 179, 6122-6126.

White, O., J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, E. K. Hickey, J. D. Peterson, R. J. Dodson *et al.* (1999), *Science* 286, 1571-1577.

Williams, M. V. und G. J. Tritz (1977), *J. Antimicrob. Chem.* 3, 65-77.

Williams, M. V., T. J. Kerr, R. D. Lemmon und G. J. Tritz (1980), *J. Bacteriol.* 143, 383-388.

Willis, R. C. und C. A. Woolfolk (1974), *J. Bacteriol.* 118, 231-241.

Winterhalter, C. und W. Leinfelder (1997), Europäisches Patent 0885962A1.

Wlodek, L., M. Wrobel und J. Czubak (1993), *Int. J. Biochem.* 25, 107-112.

Y

Yamada, H., H. Kumagi und H. Ohkishi (1976), US Patent 3.974.031.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira und J. Messing (1985), *Gene* 33, 103-109.

Z

Zakataeva, N. P., V. V. Aleshin, I. L. Tokmakova, P. V. Troshin und V. A. Livshits (1999), *FEBS Lett.* 452, 228-232.

Ziment, I. (1988), *Biomed. Pharmacother.* 42, 513-519.

DANK

In erster Linie möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. A. Böck bedanken, unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit entstand. Von seiner großen Sachkenntnis und seinen richtungsweisenden Ratschlägen hat diese Arbeit und habe vor allem ich selber sehr viel profitiert. Nicht zuletzt seinem guten Kontakt zum *Consortium für elektrochemische Industrie* ist es zu verdanken, daß ich zunächst als "Außenstelle" einen kleinen Beitrag zu dem spannenden Thema "Cystein-Produktion" leisten durfte und ich seit geraumer Zeit nun direkt vor Ort an einem neuen, ebenso faszinierenden Projekt mitarbeiten kann.

Desweiteren danke ich den Verantwortlichen des *Consortiums*, namentlich den Herren Dr. G. Wich, Dr. T. Maier und Dr. C. Winterhalter für die ausgezeichnete Zusammenarbeit während der letzten Jahre, die neben der Bereitstellung mancher Stämme und Konstrukte auch ständige Diskussionsbereitschaft und großes Vertrauen in meine Arbeit beinhaltete. Ich freue mich, daß ein Teil meiner Ergebnisse bereits Eingang in bestehende und neue Verfahren gefunden hat.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. C. Gaebert vom *Consortium*, der durch die Analyse einiger Kulturüberstände entscheidend zur Identifizierung verschiedener Exkretionsprodukte beigetragen hat.

Die Aminosäure-Analyse mittels des ASA wäre ohne die geduldige Hilfe von Herrn Prof. Dr. F. Fiedler und Frau Dr. K. Schubert nicht möglich gewesen - vielen Dank auch dafür.

Schließlich möchte ich mich noch ganz herzlich bei allen anderen Mitarbeitern am Lehrstuhl für Mikrobiologie für ihre große Hilfsbereitschaft und Unterstützung in allen möglichen und unmöglichen Situationen bedanken.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name: Tobias Daßler
Geburtsdatum: 01. September 1970
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Eltern: Herbert Daßler, verstorben 1990
Elfriede Daßler, Rentnerin

Ausbildung:

1976-1980: Grundschule an der Forellenstraße, München
1980-1989: Michaeli-Gymnasium in München, mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig; Abitur
1989-1990: Zivildienst
1991-1997: Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München; Diplom
1997-2001: Bearbeitung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Böck